31988L0302

30.5.1988 *JURNALUL OFICIAL AL COMUNITĂȚILOR EUROPENE* L 133/1

DIRECTIVA COMISIEI
din 18 noiembrie 1987
de efectuare a celei de-a noua adaptări la progresul tehnic a Directivei 67/548/CEE a Consiliului privind apropierea actelor cu putere de lege și a actelor administrative referitoare la clasificarea, ambalarea și etichetarea substanțelor periculoase

(88/302/CEE)

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Economice Europene,

având în vedere Directiva 67/548/CEE a Consiliului din 27 iunie 1967 privind apropierea actelor cu putere și a actelor administrative referitoare la clasificarea, ambalarea și etichetarea substanțelor periculoase [1], supusă celei de-a șasea modificări prin Directiva 79/831/CEE [2] și, în special, articolul 19 al acesteia,

întrucât articolul 3 alineatul (1) din Directiva 67/548/CEE prevede că proprietățile fizico-chimice, toxicitatea și ecotoxicitatea substanțelor și preparatelor se stabilesc în conformitate cu metodele specificate în anexa V;

întrucât articolul 3 alineatul (2) din Directiva 67/548/CEE prevede că pericolul ecologic real sau potențial pe care îl reprezintă o substanță sau un preparat se evaluează în raport cu caracteristicile stabilite în anexele VII și VIII;

întrucât anexa V la versiunea introdusă prin Directiva 84/449/CEE [3] a Comisiei conține în prezent numai metodele de testare care corespund caracteristicilor detaliate în anexa VII și este necesar să se pună la dispoziție și metode de testare corespunzătoare caracteristicilor detaliate în anexa VIII;

întrucât dispozițiile prezentei directive sunt conforme cu avizul Comitetului pentru adaptarea la progresul tehnic a directivelor privind eliminarea barierelor tehnice din calea comerțului cu substanțe și preparate periculoase,

ADOPTĂ PREZENTA DIRECTIVĂ:

Articolul 1

Textul anexei la prezenta directivă se adaugă la anexa V la Directiva 67/548/CEE.

Articolul 2

Statele membre adoptă și publică până la 31 decembrie 1988 măsurile necesare pentru a se conforma prezentei directive și informează de îndată Comisia cu privire la aceasta. Statele membre aplică aceste măsuri până la 30 iunie 1989.

Articolul 3

Prezenta directivă se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles la 18 noiembrie 1987.

Pentru Comisie

Stanley CLINTON DAVIS

Membru al Comisiei

---

[1] JO L 196, 16.8.1967, p. 1/67.
[2] JO L 259, 15.10.1979, p. 10.
[3] JO L 251, 19.9.1984, p. 1.

ANEXĂ

Metodele de testare descrise în prezenta vizează determinarea unora din proprietăţile toxicologice şi ecotoxicologice enumerate în anexa VIII la Directiva 79/831/CEE a Consiliului. Sunt descrise metodele de testare corespunzătoare nivelului 1 şi nivelului 2 din anexa VIII, dar testele nu sunt subdivizate în funcţie de diferitele niveluri.

CUPRINS

	Pagina
PARTEA B: Metode pentru stabilirea toxicității	83
Introducere generală, partea B	83
Studiu de toxicitate subcronică – administrare orală – Doză orală administrată timp de 90 de zile unor specii de rozătoare	87
Studiu de toxicitate subcronică – administrare orală – Doză orală administrată timp de 90 de zile unor specii nerozătoare	91
Studiu de toxicitate subcronică – administrare cutanată – Doză cutanată administrată timp de 90 de zile unor specii rozătoare	95
Studiu de toxicitate subcronică - administrare prin inhalare – Doză inhalată administrată timp de 90 de zile unor specii rozătoare	99
Studiu de teratogeneză – rozătoare și nerozătoare	103
Studiu de toxicitate cronică	106
Studiu de cancerogeneză	111
Studiu combinat de toxicitate cronică și de cancerogeneză	116
Studiu de toxicitate privind reproducerea la o generație	122
Studiu de toxicitate privind reproducerea la două generații	126
Toxicocinetica	130
Teste de mutageneză și de depistare a cancerogenezei	134
- Mutația genică – *Saccharomyces cerevisiae*	134
- Recombinarea mitotică - *Saccharomyces cerevisiae*	137
- Test *in vitro* de mutație genică pe celule de mamifere	140
- Alterarea și repararea ADN-ului – sinteza neprogramată a ADN (uds – *unscheduled dna synthesis*) – test *in vitro* pe celule de mamifere	143
- Test *in vitro* de schimbare a cromatidelor surori (SCE)	147
- Test de letalitate recesivă în raport cu sexul la *Drosophila melanogaster* (SLRL)	150
- Test *in vitro* de transformare a celulelor de mamifere	152
- Test de letalitate dominantă la rozătoare	155
- Studiu citogenetic *in vivo* al celulelor germinale de mamifere	158
- Testul petei (spot test) la șoarece	161
- Translocații ereditare la șoareci	164
PARTEA C: Metode de determinare a ecotoxicității	167
Introducere generală: partea C	167
Test de inhibiție a creșterii algelor	168
Toxicitatea la râme: Test pe sol artificial	174
Biodegradare: Metoda Zahn – Wellens	178
Biodegradare: Teste de simulare cu nămol activ	185
Biodegradare: Nămol activ: test de inhibiție a respirației	197
Biodegradare: Test SCAS modificat	202

PARTEA B: METODE PENTRU STABILIREA TOXICITĂȚII

INTRODUCERE GENERALĂ: PARTEA B

STUDII DE LUNGĂ DURATĂ

Studii de toxicitate subcronică, cronică și cancerogeneză

Caracterizarea substanței de testat și a amestecului utilizat pentru tratament

Compoziția substanței de testat, inclusiv impuritățile majore, și proprietățile sale fizico-chimice relevante, inclusiv stabilitatea, trebuie să fie cunoscute înainte de începerea oricărui studiu de toxicitate.

Proprietățile fizico-chimice ale substanței de testat furnizează informații importante cu privire la alegerea căii de administrare, conceperea studiilor de toxicitate subcronică, cronică și de cancerogeneză, precum și la manipularea și depozitarea substanței de testat.

Informațiile privind structura chimică și proprietățile fizico-chimice pot, de asemenea, furniza indicații cu privire la caracteristicile de absorbție pe calea de administrare prevăzută și la posibilitățile metabolice și de distribuire în țesuturi. De asemenea, pot exista informații cu privire la parametrii toxicocinetici din studiile de toxicitate și toxicocinetice precedente.

Inițierea studiului trebuie precedată de elaborarea unei metode analitice de caracterizare calitativă și cantitativă a substanței de testat (inclusiv impuritățile majore, dacă este posibil) în mediul de dozare și în materialul biologic.

Animale de experiență: selectarea speciei și a liniei de descendență

Dat fiind faptul că este necesară tratarea animalelor de-a lungul unui segment semnificativ din viața lor, studiile tind să se limiteze la speciile de laborator ușor de întreținut și cu viață relativ scurtă. Este de dorit să se cunoască incidența bolilor și tumorilor spontane la liniile de animale utilizate, atunci când sunt crescute în condiții similare.

Liniile trebuie să fie bine definite și să nu prezinte defecte congenitale care pot interfera cu efectele testelor. Din acest punct de vedere, folosirea liniilor consangvine, a hibrizilor F1 prezintă câteva avantaje, însă dacă există date istorice suficiente cu privire la proveniența liniilor neconsangvine, obținute prin încrucișarea obișnuită a unor animalele care provin din colonii închise, acestea pot fi acceptate.

Îngrijirea animalelor, regimul alimentar și de apă

Testele și studiile realizate pe animale se desfășoară în conformitate cu reglementările naționale și iau în considerare principiile umanitare și progresele internaționale înregistrate în domeniul protecției animalelor.

Controlul riguros al condițiilor de mediu și folosirea unor tehnici adecvate de îngrijire a animalelor sunt obligatorii pentru obținerea unor rezultate concludente. Factori cum ar fi condițiile de adăpostire, bolile supraadăugate, terapia medicamentoasă, impuritățile din regimul alimentar, aerul, apa și culcușul, precum și instalațiile de îngrijire generală a animalelor pot influența în mod semnificativ rezultatelor studiilor cu doze repetate. În general, trebuie să se cunoască efectul produselor chimice sterilizante asupra studiului.

Regimul alimentar trebuie să respecte toate cerințele nutriționale ale speciei testate și nu trebuie să conțină impurități care ar putea influența rezultatul testului. Rozătoarele trebuie să primească hrană și apă *ad libitum*, iar hrana să fie înlocuită cel puțin săptămânal. În prezent, sunt utilizate trei tipuri de regim alimentar: convențional, sintetic și diferite regimuri alimentare cu formulă deschisă.

Indiferent de regimul alimentar ales, furnizorii trebuie să stabilească prin monitorizare periodică valoarea nutritivă și nivelul substanțelor contaminante din regimul alimentar de bază și să prezinte aceste informații laboratorului împreună cu fiecare lot de hrană. Este imperativ să se cunoască efectele regimului alimentar asupra metabolismului, precum și asupra evoluției tumorilor și asupra longevității animalelor.

De asemenea, se pot efectua analize de verificare a hranei de bază de către laboratorul care realizează testul atât pentru componentele hranei, cât și pentru contaminanții accidentali, inclusiv substanțele cancerigene. Dacă se efectuează analizele, rezultatele trebuie păstrate și incluse în raportul final cu privire la fiecare substanță de testat.

Componentele obișnuite ale regimului alimentar care au efecte cunoscute asupra carcinogenezei (de exemplu: antioxidanți, acizi grași nesaturați, seleniu) nu trebuie să fie prezente în concentrații care să producă astfel de efecte. Impactul potențial al mai multor contaminanți obișnuiți ai regimului alimentar asupra evaluării cancerogenezei impune o atenție deosebită privind prezența în regimul alimentar a reziduurilor de pesticide, a compușilor organoclorurați, a hidrocarburilor aromate policiclice, a estrogenului, a metalelor grele, a nitrozaminelor și a micotoxinelor.

Dacă substanța de testat se administrează în apă sau în alimente, testele de stabilitate sunt esențiale. Testele de stabilitate și de cancerogeneză corect realizate înainte de studiile cu doze repetate trebuie utilizate pentru a stabili frecvența necesară a preparării și monitorizării regimului alimentar.

Dacă regimurile alimentare sunt sterilizate, efectele acestei acțiuni asupra substanței de testat și a componentelor regimului alimentar trebuie să fie cunoscute. Trebuie efectuate toate ajustările corespunzătoare.

Pe parcursul studiilor de cancerogeneză, cercetătorii trebuie să aibă cunoștință de potențialele substanțe contaminante din apa utilizată. Apa aprobată pentru consumul uman este în general satisfăcătoare și trebuie să fie disponibile informații cu privire la compoziția acesteia.

Concentrația unei substanțe de testat în regimul alimentar poate necesita ajustări pe măsură ce animalele cresc, pentru a menține o absorbție constantă a substanței de testat în raport cu greutatea organismului.

Valoarea nutritivă a regimurilor alimentare martor trebuie să fie cât mai asemănătoare cu a regimurilor alimentare de testare. Astfel, trebuie luată în considerare valoarea nutritivă a unei substanțe de testat amestecate în regimul alimentar. Experiența sugerează că, atunci când substanțele de testat nenutritive sunt prezente în proporție de până la 5 % în regimul alimentar, este improbabil ca acestea să interfereze în mod semnificativ cu valoarea nutritivă a regimului.

1. **Studii de inhalație**

Nu se specifică nici un test limită, deoarece nu a fost posibil să se definească o valoare limită unică a expunerii prin inhalare.

2. **Studiu de teratogeneză**

Metoda de testare vizează în primul rând administrarea pe cale orală. În mod alternativ, pot fi utilizate alte căi, în funcție de proprietățile fizice ale substanței de testat, sau calea probabilă de expunere umană. În astfel de cazuri, metoda de testare trebuie adaptată corespunzător, luând în considerare elementele adecvate ale metodelor de testare de 28 de zile.

3. **Toxicocinetica**

Studiile de toxicocinetică ajută la interpretarea și evaluarea datelor privind toxicitatea. Aceste studii sunt destinate să elucideze aspectele individuale ale substanței chimice testate, iar rezultatele pot ajuta la elaborarea altor studii de toxicitate. Nu se consideră că va fi necesară determinarea tuturor parametrilor în fiecare caz. Numai în situații rare este necesară întreaga serie de studii toxicocinetice (absorbție, excreție, distribuție și metabolism). În cazul anumitor compuși, pot fi recomandabile modificări în această serie sau pot fi suficiente studii cu doză unică.

Definiții

Toxicocinetică:	studiul absorbției, distribuției, metabolismului și excreției substanțelor de testat;
Absorbție:	procesul sau procesele prin care o substanță administrată pătrunde în organism;
Excreție:	procesul sau procesele prin care o substanță administrată și/sau metaboliții acesteia sunt eliminați din organism;
Distribuție:	procesul sau procesele prin care substanța absorbită și/sau metaboliții acesteia sunt repartizați în organism;
Metabolism:	procesul sau procesele prin care substanța administrată este modificată din punct de vedere structural în organism, fie prin intermediul reacțiilor enzimatice, fie prin cel al reacțiilor non-enzimatice.

4. **Studiu de toxicitate acută și subacută pe o a doua specie**

Scopul studiului pe o a doua specie este acela de a completa concluziile extrase din primul.

În cazul unui studiu pe o a doua specie, metoda de testare deja descrisă poate fi utilizată sau adaptată pentru un număr mai mic de animale.

5. **Studii de fertilitate**

Dacă este necesar un studiu cu privire la reproducerea a trei generații, metoda descrisă în cazul reproducerii a două generații poate fi extinsă astfel încât să includă și a treia generație.

6. **Studii de mutageneză**

Teste suplimentare de mutageneză inclusiv teste de depistare a cancerogenezei

În anexa VIII la directivă sunt menționate studii suplimentare de investigare extensivă a mutagenezei sau studii de depistare preliminară a cancerogenezei. Studiile menționate în prezenta secțiune pot fi, în general, utilizate la investigarea oricăruia din aceste două aspecte.

Introducere

Evaluarea inițială a activității mutagene a unei substanțe constă din prelevarea de probe pentru decelarea mutațiilor genice (punctiforme) la bacterii și a deteriorării citogenetice a celulelor mamiferelor (*in vitro* sau *in vivo*); metode corespunzătoare pentru aceste studii din „setul de bază" au fost descrise anterior. Prezenta secțiune privește studiile suplimentare corespunzătoare pentru verificarea și/sau extinderea rezultatelor obținute în setul de bază și care pot fi utilizate în mai multe scopuri:

1. pentru a confirma rezultatele obținute în setul de bază;

2. pentru a investiga efectele care nu au fost studiate în setul de bază;

3. pentru a iniția sau extinde studii *in vivo*.

În acest sens, gama de teste descrise include atât sistemele eucariote *in vitro* și *in vivo*, precum și o gamă largă de efecte biologice. Testele furnizează informații cu privire la mutațiile genice punctiforme în organisme mai complexe decât bacteriile utilizate în setul de bază și extind informațiile cu privire la capacitatea unei substanțe de a induce aberații cromozomiale.

De asemenea, mai sunt descrise testele pentru alte efecte decât mutațiile genice punctiforme și aberațiile cromozomiale. Acestea furnizează informații suplimentare și pot fi utilizate, după caz, în programele de testare.

Ca principiu general, când se ia în considerare un program de studii suplimentare de mutageneză, acesta trebuie conceput astfel încât să furnizeze informații suplimentare relevante privind mutageneza și/sau cancerogeneza substanței în cauză.

Studiile care se dovedesc adecvate într-o situație specifică depind de numeroși factori, inclusiv de caracteristicile chimice și fizice ale substanței, de rezultatele prelevărilor bacteriene și citogenetice inițiale, de profilul metabolic al substanței, de rezultatele celorlalte studii de toxicitate și de utilizările cunoscute ale substanței. De aceea, un program rigid pentru selectarea testelor este inadecvat, având în vedere varietatea de factori care trebuie luați în considerare. Cu toate acestea, câteva principii generale se pot folosi orientativ. Dacă un test a fost pozitiv în setul de bază, studiile suplimentare trebuie să includă cel puțin un test care să poată depista același efect genetic. Dacă ambele teste din setul de bază au fost negative, în mod normal studiile suplimentare trebuie să includă un test cu privire la mutațiile genice, precum și un test privind aberațiile cromozomiale. De asemenea, poate fi oportună obținerea de date suplimentare din testele indicatoare (enumerate mai jos).

Metodele care permit astfel de cercetări sunt grupate mai jos în funcție de efectul lor genetic principal.

Studii pentru decelarea mutațiilor genice (punctiforme)

Pentru o mai bună cunoaștere a potențialului unei substanțe de a produce mutații genice, ar putea fi utile unul sau mai multe din testele următoare:

(a) studiul mutației directe sau inverse la microorganismele eucariote (*Saccharomyces cerevisiae*);

(b) studii *in vitro* pentru decelarea mutației directe la celulele de mamifere;

(c) studiul genei letale recesive legate de sex la *Drosophila melanogaster*;

(d) studiul mutației somatice *in vivo*: testul petei la șoareci.

Studii pentru decelarea aberațiilor cromozomiale

Pentru o mai bună cunoaștere a potențialului unei substanțe de a produce aberații cromozomiale, se pot dovedi adecvate unul sau mai multe din testele următoare:

(a) studii citogenetice *in vivo* pe mamifere;

Analiza *in vivo* a celulelor din măduva osoasă aflate în metafază trebuie luată în considerare, dacă nu a fost inclusă în evaluarea inițială (studiile din „setul de bază"). De asemenea, poate fi cercetată *in vivo* citogenetica celulelor germinale;

(b) studii citogenetice *in vitro* pe celule de mamifere, dacă acestea nu au fost incluse în evaluarea inițială;

(c) studiul genei letale dominante la rozătoare;

(d) testul translocației ereditare la șoarece.

Teste indicatoare privind efectele asupra ADN-ului

Există metode care dau indicii cu privire la anumite efecte asupra ADN-ului care nu se materializează printr-un eveniment mutagen, cum ar fi „punctul final". Aceste studii pot furniza informații complementare celor obținute din studiilor de mutageneză și care pot fi utile la interpretarea acestor studii. Atunci când este necesară efectuarea acestor teste, se poate utiliza una din metodele următoare care folosesc microorganisme eucariote sau celule de mamifere:

(a) recombinație mitotică la *Saccharomyces cerevisiae*;

(b) alterarea și repararea ADN – sinteză neprogramată ADN – celule de mamifere (*in vitro*);

(c) schimbul de cromatide surori la celulele de mamifere (*in vitro*).

Alte teste indicatoare ale cancerogenezei

Sunt disponibile încercări de transformare a celulelor de mamifere care pot măsura capacitatea unei substanțe de a determina în cultura celulară schimbări morfologice și comportamentale despre care se crede că sunt asociate cu o transformare malignă *in vivo*. Pot fi folosite utilizate mai multe tipuri de celule și criterii pentru transformare.

Evaluarea riscurilor cu privire la efectele ereditare la mamifere

Există o serie de metode de măsurare a efectelor ereditare la mamifere, produse de mutații genice (punctiforme) [(testul locusului specific la șoarece ([1])] sau pentru aberațiile cromozomiale (testul translocației ereditare la șoareci). Aceste metode pot fi utilizate la estimarea posibilului risc genetic al unei substanțe pentru om. Cu toate acestea, având în vedere complexitatea pe care o presupun aceste teste și numărul foarte mare de animale necesare, în special pentru testul locusului specific la șoarece, înainte de a proceda la aceste studii este nevoie de o justificare solidă.

([1]) Testul locusului specific la șoarece (care nu este descris în prezentul document) poate fi utilizat pentru măsurarea mutațiilor celulelor germinale la prima generație după expunerea la o substanță mutagenă. Pot fi identificate și cuantificate transformările genetice care conduc la modificări ale produselor genetice care produc fenotipuri vizibile.

STUDIU DE TOXICITATE SUBCRONICĂ - ADMINISTRARE ORALĂ

DOZĂ ORALĂ ADMINISTRATĂ TIMP DE 90 DE ZILE UNOR SPECII DE ROZĂTOARE

1. METODĂ

1.1. Introducere

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. Definiții

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. Substanțe de referință

Nici una.

1.4. Principiul metodei de testare

Se administrează zilnic substanța de testat, pe cale orală, în doze crescătoare, la mai multe loturi de animale de experiență, o doză pe lot fiind administrată timp de 90 de zile. Pe parcursul perioadei de administrare, se observă animalele zilnic pentru a pune în evidență efectele toxice. Animalele care mor în timpul testului, precum și cele care supraviețuiesc la sfârșitul testului sunt supuse unei autopsii.

1.5. Criterii de calitate

Nici unul.

1.6. Descrierea metodei de testare

Pregătiri

Se țin animalele în condițiile de adăpostire și de alimentare specifice experimentului cel puțin în cele 5 zile care îl preced. Înainte de începerea testului, animalele tinere sănătoase se repartizează aleatoriu în loturi tratate și loturi martor.

Substanța de testat se poate administra în hrană, prin gavaj, sub formă de capsule sau în apa de băut. Dozele se administrează în același mod pe tot parcursul experimentului. Dacă se folosește un vehicul sau alt tip de aditiv pentru a facilita administrarea, acesta trebuie să fie netoxic. Pot fi folosite date istorice, după caz.

Condiții experimentale

Animale de experiență

Cu excepția contraindicațiilor, specia preferată este șobolanul. Se folosesc animale tinere, sănătoase, aparținând unei linii de laborator obișnuite; în condiții ideale, se administrează substanța înainte ca șobolanii să atingă vârsta de 6 săptămâni; aceștia nu pot fi folosiți dacă au mai mult de 8 săptămâni. La începutul studiului, diferența de greutate între animale nu trebuie să depășească cu mai mult de ± 20 % valoarea medie. Atunci când studiul de toxicitate subcronică prin administrare orală este efectuat ca fază preliminară a unui studiu pe termen lung, trebuie să se folosească aceeași specie și linie pentru ambele studii.

Număr și sex

Se folosesc cel puțin 20 de animale (10 femele și 10 masculi) pentru fiecare doză. Femelele trebuie să fie nulipare și negestante. Dacă se prevede sacrificarea unui număr de animale pe parcursul studiului, acest număr se adaugă la total. În plus, se poate trata un lot satelit de 20 de animale (10 din fiecare sex) la doza cea mai mare timp de 90 de zile, care poate fi supus observației vizând reversibilitatea, persistența sau apariția tardivă a efectelor toxice pe parcursul celor 28 zile care urmează tratamentului.

Doze

Se folosesc cel puțin trei doze și un lot martor. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, animalele din lotul martor se tratează în același mod ca și subiecții din loturile tratate. Dacă se folosește un vehicul pentru a facilita administrarea, acesta se administrează martorilor în același mod ca și loturilor tratate, iar volumul corespunde celui administrat lotului tratat cu doza maximă. Doza maximă trebuie să producă efecte toxice, dar nu trebuie să provoace sau provoacă rar moartea. Doza minimă nu trebuie să provoace nici un efect toxic. Când există informații privind expunerea umană, doza cea mai mică trebuie să fie superioară acestei valori. În condiții ideale, doza medie trebuie să producă efecte toxice minime observabile. Dacă se folosesc mai multe doze intermediare, acestea se administrează eșalonat, astfel încât să provoace o gradare a efectelor toxice.

În loturile care corespund dozelor mici și intermediare, precum și în lotul martor, incidența mortalității trebuie să fie mică, pentru a permite o evaluare semnificativă a rezultatelor.

Atunci când se administrează substanța de testat în hrană, se poate folosi fie o concentrație alimentară constantă (ppm sau mg/kg), fie o doză constantă, în raport cu greutatea corporală a animalelor; se precizează metoda aleasă. În cazul unei substanțe administrate prin gavaj, dozele se administrează zilnic în același moment. Dozele trebuie să facă obiectul unei adaptări (săptămânale sau bisăptămânale) pentru a menține constant nivelul dozei, în raport cu greutatea corporală a animalului.

Test limită

Dacă în urma unei experiențe de 90 de zile efectuată conform metodei descrise mai jos, la o doză de 1 000 miligrame pe kilogram de greutate corporală pe zi sau la un nivel de doză mai ridicat, în funcție de expunerea umană posibilă (când se cunoaște această valoare) nu apare nici un efect toxic, continuarea experienței poate fi inutilă. În cazul substanțelor cu toxicitate scăzută, administrate în hrană, se iau măsuri pentru ca proprietățile și cantitatea acestora să nu interfereze cu cerințele nutriționale normale.

Perioada de observație

Se observă toate animalele zilnic; se consemnează simptomele de toxicitate, precum și momentul apariției acestora, intensitatea și durata. Se consemnează momentul morții și momentul când apar și dispar simptomele de toxicitate.

Mod de operare

În mod ideal, se administrează dozele de substanță de testat șapte zile pe săptămână, pe o perioadă de 90 de zile. Animale aparținând loturilor satelit prevăzute pentru observații suplimentare se țin sub observație încă 28 zile pentru a studia refacerea sau persistența efectelor toxice.

Observațiile în cușcă includ modificări ale pielii, ale blănii, ale ochilor și ale mucoaselor, ale aparatului respirator, ale sistemului circulator, ale sistemului nervos autonom și central, precum și ale activității somato-motrice și ale comportamentului. Se determină săptămânal consumul de hrană (și consumul de apă, atunci când substanța de testat se administrează în apa de băut), precum și greutatea animalelor.

Animalele se observă cu regularitate pentru a evita pe cât posibil pierderea acestora din motive exterioare experimentului, cum ar fi: canibalism, autoliză a țesuturilor sau greșeală de plasare a exemplarelor. Se supun autopsiei toate animalele supraviețuitoare care aparțin loturilor nesatelit tratate. Animalele muribunde se scot imediat și se supun autopsiei.

Examinările următoare se efectuează, de regulă, asupra tuturor animalelor, inclusiv asupra martorilor:

(a) examenul oftalmologic, folosind un oftalmoscop sau un instrument echivalent corespunzător, trebuie făcut înainte de administrarea substanței de testat și la terminarea studiului, de preferință tuturor animalelor, dar cel puțin celor din lotul tratat cu doza cea mai mare și din lotul martor. Dacă se constată modificări oculare, se vor examina toate animalele;

(b) examenul hematologic, inclusiv hematocritul, concentrația hemoglobinei, numărul de hematii, numărul de leucocite și măsurători ale potențialului de coagulare, cum ar fi timpul de coagulare, timpul de protrombină, timpul de tromboplastină sau numărul de trombocite se măsoară la sfârșitul perioadei de testare;

(c) determinările biochimice clinice ale sângelui se realizează la sfârșitul perioadei de testare. Testele considerate caracteristice pentru toate studiile sunt: balanța electrolitică, metabolismul carbohidraților, funcția hepatică și renală. Alegerea unor determinări specifice depinde de observațiile asupra modului de acțiune a substanței de testat. Se pot sugera următoarele determinări: calciu, fosfor, clor, sodiu, potasiu, glucoza à jeun (cu privare

de hrană pentru o perioadă caracteristică speciei), transaminaza serică glutamo-piruvică ([1]), transaminaza serică glutamo-oxaloacetică ([2]), ornitin decarboxilază, gama-glutamil transpetidaza, ureea, albumina, creatinina sanguină, bilirubina totală și proteinele totale. Pentru o evaluare toxicologică adecvată pot fi necesare și alte determinări, care includ analizarea lipidelor, hormonilor, echilibrul acidobazic, methemoglobina și activitatea colinesterazică. Se pot efectua, dacă este necesar, și alte determinări biochimice clinice pentru a extinde investigațiile asupra efectelor observate;

(d) nu este necesară efectuarea cu regularitate a analizei de urină, ci numai atunci când există o indicație bazată pe o toxicitate presupusă sau observată.

Dacă datele istorice de bază sunt insuficiente, înainte de începerea tratamentului trebuie să se determine parametrii hematologici și biochimici clinici.

Autopsia

Toate animalele fac obiectul unei autopsii generale, aceasta incluzând aspectul exterior al corpului, toate orificiile, cavitatea craniană, toracică și cea abdominală și conținutul acestora. Ficatul, rinichii, glandele suprarenale și testiculele trebuie cântărite în stare umedă, cât mai repede posibil după disecție, pentru a se evita deshidratarea.

În vederea unor posibile examene histopatologice ulterioare, următoarele organe și țesuturi vor fi păstrate într-un mediu corespunzător: toate leziunile macroscopice, creier, inclusiv secțiuni prin bulb/punte, cortex cerebelos și cortex cerebral, glanda pituitară, tiroida/paratiroidele, țesut timic, traheea și plămânii, inimă, aortă, (glandele salivare), ficat, splină, rinichi, glande suprarenale, pancreas, gonade, uter (glande genitale anexe), (piele), esofag, stomac, duoden, jejun, ileon, cec, colon, rect, vezică urinară, ganglioni limfatici reprezentativi, (glanda mamară la femele), (musculatura coapsei), nervi periferici, stern cu măduvă osoasă, (ochi), (femur - inclusiv articulația), (măduva spinării la trei niveluri – cervical, torace mediu și lombar) și (glande lacrimale extraorbitale). Țesuturile menționate între paranteze trebuie examinate doar atunci când acest lucru este indicat prin apariția semnelor de toxicitate sau implicarea organelor țintă.

Examenul histopatologic

(a) Se efectuează examen histopatologic complet pentru toate organele și țesuturile recoltate de la animalele din lotul martor și loturile expuse la doza cea mai mare;

(b) Se examinează toate leziunile macroscopice;

(c) Se examinează organele-țintă ale animalelor din loturile expuse la celelalte doze;

(d) Se examinează histopatologic plămânii animalelor din lotul expus la doza mică și la cea intermediară pentru a detecta infecțiile, deoarece acestea oferă o evaluare acceptabilă a stării de sănătate a animalelor. Trebuie să fie luată în considerare, de asemenea, examinarea histopatologică a ficatului și rinichiului în cazul acestor loturi. La animalele din aceste loturi nu se face în mod curent un examen histopatologic suplimentar, dar acesta trebuie efectuat întotdeauna pe organele care au prezentat leziuni în lotul expus la doza maximă;

(e) Atunci când este folosit un lot satelit, trebuie să se efectueze un examen histopatologic pe țesuturile și organele care au prezentat leziuni în loturile tratate.

2. **REZULTATE**

Datele se sistematizează într-un tabel care indică, pentru fiecare lot de experiență, numărul de animale la începutul testului și numărul de animale care prezintă fiecare tip de leziune. Toate rezultatele observate se evaluează cu ajutorul unei metode statistice adecvate. Se poate folosi orice metodă statistică recunoscută.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— specia, linia, originea, condițiile ambiante, regimul alimentar etc.;

— condițiile experimentale;

— dozele (inclusiv vehiculul, dacă este cazul) și concentrațiile;

— răspunsul toxic pe sexe și doză;

([1]) În prezent cunoscută sub denumirea de alanin aminotransferază.
([2]) În prezent cunoscută sub denumirea de aspartat aminotransferază.

— dacă este posibil, nivelul care nu are nici un efect;

— momentul morții în timpul experimentului sau indicarea faptului că animalele au supraviețuit experimentului;

— efectele toxice sau de alt tip;

— momentul observării oricărui simptom anormal și evoluția acestuia;

— consumul de hrană și greutatea corporală;

— observații oftalmologice;

— examenele hematologice întreprinse și rezultatele complete;

— testele biochimice clinice practicate și rezultatele complete (inclusiv cele urinare);

— rezultatele autopsiei;

— descrierea detaliată a tuturor observațiilor histopatologice;

— tratarea statistică a rezultatelor, după caz;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare și interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

STUDIU DE TOXICITATE SUBCRONICĂ - ADMINISTRARE ORALĂ

DOZĂ ORALĂ ADMINISTRATĂ TIMP DE 90 DE ZILE UNOR SPECII NEROZĂTOARE

1. METODĂ

1.1. Introducere

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. Definiții

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. Substanțe de referință

Nici una.

1.4. Principiul metodei de testare

Se administrează zilnic substanța de testat, pe cale orală, în doze crescătoare, la mai multe loturi de animale de experiență (nerozătoare), o doză pe lot fiind administrată timp de 90 de zile. Pe parcursul perioadei de administrare, se observă animalele zilnic pentru a pune în evidență efectele toxice. Animalele care mor în timpul testului, precum și cele care supraviețuiesc la sfârșitul testului sunt supuse unei autopsii.

1.5. Criterii de calitate

Nici unul.

1.6. Descrierea metodei de testare

Pregătiri

Se țin animalele în condițiile de adăpostire și de alimentare specifice experimentului cel puțin în cele 5 zile care îl preced. Înainte de începerea testului, animalele tinere sănătoase se repartizează aleatoriu în loturi tratate și loturi martor.

Substanța de testat se poate administra în hrană, prin gavaj, sub formă de capsule sau în apa de băut. Se pot folosi și alte metode de administrare orală. Dozele se administrează în același mod la toate animalele pe tot parcursul experimentului [TF1]. Dacă, pentru a facilita administrarea, se folosește un vehicul sau alt tip de aditiv, acesta trebuie să fie netoxic. Pot fi folosite date existente, după caz.

Condiții experimentale

Animale de experiență

Cea mai folosită specie nerozătoare este câinele, preferabil dintr-o rasă definită. Pot fi folosite și alte specii nerozătoare. Se folosesc animale tinere, sănătoase, iar în cazul câinelui tratamentul trebuie să înceapă la vârsta de 4 – 6 luni, fără a se depăși vârsta de 9 luni. Când studiul de toxicitate subcronică prin administrare orală este efectuat ca fază preliminară a unui studiu pe termen lung, trebuie să se folosească aceeași specie/linie pentru ambele studii.

Număr și sex

Se folosesc cel puțin opt animale (patru femele și patru masculi) pentru fiecare nivel al dozei de tratament. Numărul animalelor la sfârșitul experimentului trebuie să fie suficient pentru a se putea face o evaluare semnificativă a efectelor toxice.

Doze

Se folosesc cel puțin trei doze și un lot martor. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, animalele din lotul martor se tratează în același mod ca și subiecții din loturile tratate. Doza maximă trebuie să producă efecte toxice, dar nu trebuie să provoace moartea. Doza minimă nu trebuie să provoace nici un efect toxic. Când există informații privind expunerea umană, doza minimă trebuie să fie superioară acestei valori.

În condiții ideale, doza intermediară trebuie să producă efecte toxice minime observabile. Dacă se folosesc mai multe doze intermediare, acestea se administrează eșalonat, astfel încât să provoace o gradare a efectelor toxice.

În loturile care corespund dozelor mici și intermediare, precum și în lotul martor, nu trebuie să se înregistreze mortalitate.

În cazul substanțelor cu toxicitate scăzută, este important să se ia măsuri astfel încât, când sunt administrate în hrană, cantitățile de substanță să nu interfereze cu nutriția normală.

Atunci când se administrează substanța de testat în hrană, se poate folosi fie o concentrație alimentară constantă (ppm sau mg/kg), fie o doză constantă, în raport cu greutatea corporală a animalelor; se precizează metoda aleasă. Dacă doza se administrează direct, de exemplu prin capsule, atunci tratamentul se efectuează zilnic, la aceeași oră; doza trebuie ajustată săptămânal pentru a menține constant nivelul dozei în raport cu greutatea corporală a animalelor. Atunci când studiul de toxicitate subcronică prin administrare orală este efectuat ca fază preliminară a unui studiu pe termen lung, trebuie să se folosească un regim alimentar similar în ambele studii.

Test limită

Dacă în urma unei experiențe de 90 de zile efectuată conform metodei descrise mai jos, la o doză de 1 000 miligrame pe kilogram de greutate corporală pe zi sau la un o doză mai mare, în funcție de expunerea umană posibilă (când se cunoaște această valoare), nu apare nici un efect toxic, continuarea experienței poate fi inutilă. În cazul substanțelor cu toxicitate scăzută, administrate în hrană, se iau măsuri pentru ca proprietățile și cantitatea acestora să nu interfereze cu exigențele nutriționale normale.

Perioada de observație

Se observă toate animalele zilnic; se consemnează simptomele de toxicitate, precum și momentul apariției acestora, intensitatea și durata. Se consemnează momentul morții și momentul când apar și dispar simptomele de toxicitate.

Mod de operare

În mod ideal se administrează dozele de substanță de testat șapte zile pe săptămână, pe o perioadă de 90 de zile. Cu toate acestea, din considerente practice, dacă substanțele nu se administrează prin hrană, ci în alt mod, este acceptabil tratamentul timp de cinci zile pe săptămână.

Observațiile cuprind modificări ale părului, ale blănii, ale ochilor și ale mucoaselor, ale aparatului respirator, ale sistemului circulator, ale sistemului nervos autonom și central, precum și ale activității somato-motrice și ale comportamentului, fără a se limita doar la acestea. Se determină săptămânal consumul de hrană (și consumul de apă când substanța de testat se administrează în apa de băut), precum și greutatea animalelor.

Zilnic se va efectua o examinare clinică a animalelor și se vor lua măsurile necesare pentru a reduce la minimum pierderea de animale. Se supun autopsiei toate animalele supraviețuitoare la sfârșitul perioadei de expunere. Animalele muribunde se scot imediat și se supun autopsiei.

Examinările următoare se efectuează, de regulă, asupra tuturor animalelor, inclusiv asupra martorilor:

(a) examenul oftalmologic, folosind un oftalmoscop sau un instrument echivalent corespunzător, trebuie făcut înainte de administrarea substanței de testat și la terminarea studiului, de preferință tuturor animalelor, dar cel puțin celor din lotul tratat cu doza cea mai mare și din lotul martor. Dacă se constată modificări oculare, se vor examina toate animalele;

(b) examenul hematologic, inclusiv hematocritul, concentrația hemoglobinei, numărul de hematii, numărul de leucocite și măsurători ale potențialului de coagulare, cum ar fi timpul de coagulare, timpul de protrombină, timpul de tromboplastină sau numărul de trombocite se măsoară la început, apoi fie lunar, fie la jumătatea perioadei de testare și în final la sfârșitul perioadei de testare;

(c) determinările biochimice clinice ale sângelui se realizează la început, apoi fie lunar, fie la jumătatea perioadei de testare și în final la sfârșitul perioadei de testare. Testele considerate caracteristice pentru toate studiile sunt: balanța electrolitică, metabolismul carbohidraților, funcția hepatică și renală. Alegerea unor determinări specifice depinde de observațiile asupra modului de acțiune a substanței de testat. Se pot sugera următoarele determinări: calciu, fosfor, clor, sodiu, potasiu, glucoza à jeun (cu privare de hrană pentru o perioadă caracteristică speciei), transaminaza serică glutamo-piruvică ([1]), transaminaza serică glutamo-oxaloacetică ([2]), ornitin decarboxilază, gama-glutamil transpetidaza, ureea, albumina, creatinina sanguină, bilirubina totală și proteinele totale. Pentru o evaluare toxicologică adecvată

([1]) În prezent cunoscută sub denumirea de alanin aminotransferază.
([2]) În prezent cunoscută sub denumirea de aspartat aminotransferază.

pot fi necesare și alte determinări, care includ analizarea lipidelor, hormonilor, echilibrul acidobazic, methemoglobina și activitatea colinesterazică. Se pot efectua, dacă este necesar, și alte determinări biochimice clinice pentru a extinde investigațiile asupra efectelor observate. Animalele care nu fac parte din ordinal rozătoarelor sunt ținute fără hrană o perioadă de timp (care nu depășește 24 ore) înainte de prelevarea probelor de sânge;

(d) Nu este necesară efectuarea cu regularitate a analizei de urină, ci numai atunci când există o indicație bazată pe o toxicitate presupusă sau observată.

Autopsia

Toate animalele supuse testului fac obiectul autopsiei generale, aceasta incluzând aspectul exterior al corpului, toate orificiile, cavitatea craniană, toracică și cea abdominală și conținutul acestora. Ficatul, rinichii, glandele suprarenale și testiculele trebuie cântărite în stare umedă, cât mai repede posibil după disecție, pentru a se evita deshidratarea.

În vederea unor posibile examene histopatologice ulterioare, următoarele organe și țesuturi vor fi păstrate într-un mediu corespunzător: toate leziunile macroscopice, creier, inclusiv secțiuni prin bulb/punte, cortex cerebelos și cortex cerebral, glanda pituitară hipofiza, tiroida/paratiroidele, țesut timic, (traheea), plămâni, inimă, aortă, (glandele salivare), ficat, splină, rinichi, glande suprarenale, pancreas, gonade, uter (glande genitale anexe), (piele), vezică biliară, esofag, stomac, duoden, jejun, ileon, cec, colon, rect, vezică urinară, ganglioni limfatici reprezentativi, (glanda mamară la femele), (musculatura coapsei), nervi periferici, (ochi), stern cu măduvă osoasă, (femur, inclusiv articulația), și (măduva spinării la trei nivele – cervical, torace mediu și lombar). Țesuturile menționate între paranteze trebuie examinate doar atunci când acest lucru este indicat prin apariția semnelor de toxicitate sau implicarea organelor țintă.

Examenul histopatologic

Se efectuează un examen histopatologic complet pentru toate organele și țesuturile recoltate de la animalele din lotul martor și lotul expus la doza cea mai mare. Dacă la lotul tratat cu doza cea mai mare organele prezintă leziuni sau dacă observațiile clinice impun acest lucru, se vor efectua examene histopatologice suplimentare la loturile tratate cu alte doze.

2. **REZULTATE**

Datele se sistematizează într-un tabel care indică, pentru fiecare lot de experiență, numărul de animale la începutul testului și numărul de animale care prezintă fiecare tip de leziune. Toate rezultatele observate se evaluează cu ajutorul unei metode statistice adecvate. Se poate folosi orice metodă statistică recunoscută.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— specia, linia, originea, condițiile ambiante, regimul alimentar etc.;

— condițiile experimentale;

— dozele (inclusiv vehiculul, dacă este cazul) și concentrațiile;

— răspunsul toxic pe sexe și doză;

— dacă este posibil, nivelul care nu are nici un efect;

— momentul morții în timpul experimentului sau indicarea faptului că animalele au supraviețuit experimentului;

— descrierea efectelor toxice sau de alt tip (cu atenție specială pentru constatările clinice);

— momentul observării oricărui simptom anormal și evoluția acestuia;

— consumul de hrană și greutatea corporală;

— observații oftalmologice;

— examenele hematologice întreprinse și rezultatele complete;

— testele biochimice clinice practicate și rezultatele complete;

— rezultatele autopsiei;

— descrierea detaliată a tuturor observațiilor histopatologice;

— tratarea statistică a rezultatelor, după caz;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare și interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

STUDIU DE TOXICITATE SUBCRONICĂ - ADMINISTRARE CUTANATĂ

DOZĂ CUTANATĂ ADMINISTRATĂ TIMP DE 90 DE ZILE UNOR SPECII ROZĂTOARE

1. METODĂ

1.1. Introducere

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. Definiții

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. Substanțe de referință

Nu sunt specificate.

1.4. Principiul metodei de testare

Se aplică zilnic substanța de testat pe cale cutanată, în concentrații crescătoare, mai multor loturi de testare, fiind administrată o doză pe lot timp de 90 de zile. Pe parcursul perioadei de aplicare, se observă zilnic animalele pentru a pune în evidență simptomele de toxicitate Animalele care mor în timpul testului, precum și cele care supraviețuiesc la sfârșitul testului sunt supuse autopsiei.

1.5. Criterii de calitate

Nici unul.

1.6. Descrierea metodei de testare

Pregătiri

Se țin animalele în condițiile de adăpostire și de alimentare specifice experimentului în cel puțin cele 5 zile care îl preced. Înainte de începerea testului, animalele tinere sănătoase se repartizează aleatoriu în loturi tratate și loturi martor. Cu puțin timp înainte de test, se tunde blana din regiunea dorsală a animalelor. Se poate recurge la radere, dar în acest caz operația se efectuează cu aproximativ 24 de ore înainte de test. Este necesară repetarea tunderii sau raderii la intervale de aproximativ o săptămână. În timpul tunderii sau al raderii, trebuie evitată orice lezare a pielii. Suprafața care se degajează în vederea aplicării substanței nu trebuie să fie mai mică de 10 % din suprafața corporală. Pentru a decide zona care trebuie degajată și dimensiunile suprafeței care trebuie tratată, se ia în calcul greutatea animalului. Dacă testul vizează substanțele solide care, după caz, se pot pulveriza, substanța de testat trebuie umezită cu ajutorul apei sau, la nevoie, al unui vehicul adecvat, astfel încât să se poată obține un bun contact cu pielea. Substanțele de testat lichide se folosesc în general în stare nediluată. Se efectuează o aplicare zilnică timp de cinci până la șapte zile pe săptămână.

Condiții experimentale

Animale de experiență

Animalele de laborator utilizate sunt șobolanul, iepurele sau cobaiul adult. Pot fi folosite și alte specii, dar folosirea lor trebuie justificată. La începutul experimentului, diferența de greutate între animale nu trebuie să depășească cu mai mult de ± 20 % valoarea medie. Când studiul de toxicitate subcronică prin administrare cutanată este efectuat ca fază preliminară a unui studiu pe termen lung, trebuie să se folosească aceeași specie și linie pentru ambele studii.

Număr și sex

Se folosesc, pentru fiecare doză, cel puțin 20 de animale (10 femele și 10 masculi) a căror piele este sănătoasă. Femelele trebuie să fie nulipare și negestante. Dacă se prevede sacrificarea unui număr de animale pe parcursul experimentului, acest număr se adaugă la total. În plus, se poate trata un lot satelit de 20 de animale (10 din fiecare sex) la doza cea mai mare timp de 90 de zile, care poate fi supus observației cu privire la reversibilitatea, persistența sau apariția tardivă a efectelor toxice pe parcursul celor 28 zile care urmează tratamentului.

Doze

Se folosesc cel puțin trei doze, precum și un lot martor sau, după caz, un lot martor pentru vehicul. Perioada de expunere este de cel puțin 6 ore pe zi. Se aplică substanța de testat în fiecare zi în același moment, iar dozele trebuie să facă obiectul unei adaptări (săptămânale sau bisăptămânale) pentru a menține constant nivelul dozei în raport cu greutatea corporală a animalului. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, animalele din lotul martor se tratează în același mod ca și subiecții din loturile tratate. Dacă se folosește un vehicul pentru a facilita administrarea dozei, acesta este administrat lotului martor în aceleași condiții ca și pentru loturile tratate, iar doza administrată corespunde cu cea primită de lotul tratat cu doza maximă. Doza maximă trebuie să producă efecte toxice, dar nu trebuie să provoace sau trebuie să provoace rar moartea. Doza minimă nu trebuie să provoace nici un efect toxic. Dacă există informații privind expunerea umană, doza minimă trebuie să fie superioară acestei valori. În condiții ideale, doza intermediară trebuie să producă efecte toxice minime observabile. Dacă se folosesc mai multe doze intermediare, acestea se administrează eșalonat, astfel încât să provoace o gradare a efectelor toxice. În loturile care corespund dozelor mici și intermediare, precum și în loturile martor, incidența mortalității trebuie să fie mică, pentru a permite o evaluare semnificativă a rezultatelor.

Dacă aplicarea substanței de testat provoacă o iritație cutanată gravă, se reduc concentrațiile; aceasta poate avea ca efect diminuarea, chiar dispariția, celorlalte efecte toxice la doza mare. În plus, dacă leziunile cutanate sunt foarte grave, poate fi necesară oprirea experimentului și inițierea unui studiu nou, la concentrații mai mici.

Test limită

Dacă în urma unei experiențe preliminare realizate cu o doză de 1 000 miligrame pe kilogram sau o doză mai mare în funcție de expunerea umană posibilă, când se cunoaște această valoare, nu apare nici un efect toxic, continuarea experienței poate fi inutilă.

Perioada de observație

Se observă toate animalele zilnic în vederea notării simptomelor de toxicitate. Se consemnează momentul morții și momentul când apar și dispar simptomele de toxicitate.

Mod de operare

Se pun animalele în cuști individuale. În condiții ideale, substanța de testat se administrează animalelor șapte zile pe săptămână timp de 90 de zile.

Animalele din toate loturile satelit destinate observației ulterioare sunt menținute în viață timp de încă 28 zile, fără tratament, în vederea constatării vindecării sau a persistenței efectelor toxice. Durata de expunere este de minim șase ore pe zi.

Substanța de testat se aplică pe o suprafață aproximativ egală cu 10 % din suprafața totală a corpului. În cazul substanțelor foarte toxice, suprafața tratată poate fi mai mică, dar stratul trebuie să fie cât mai subțire și mai uniform posibil.

Pe parcursul expunerii, substanța de testat se menține în contact cu pielea cu ajutorul unui pansament de tifon și al unui plasture neiritant. Suprafața tratată se acoperă astfel încât să mențină pansamentul de tifon și substanța de testat și să se evite ingerarea acesteia de către animale. Se poate folosi contenționarea pentru a împiedica animalele să ingereze substanța de testat, dar nu se recomandă imobilizarea completă.

La sfârșitul perioadei de expunere, se elimină, dacă este posibil, orice reziduu de substanță, cu apă sau cu ajutorul unui alt procedeu de curățare a pielii.

Se observă zilnic toate animalele și se înregistrează simptomele de toxicitate, precum și momentul apariției, intensitatea și durata acestora. Observația zilnică vizează, între altele, modificări ale părului și ale blănii, ale ochilor și ale mucoaselor, ale aparatului respirator, ale sistemului circulator, ale sistemului nervos autonom și central, precum și ale activității somato-motrice și ale comportamentului. Se determină săptămânal greutatea animalelor și se recomandă, de asemenea, măsurarea săptămânală a consumului de hrană. Animalele sunt observate cu regularitate pentru a evita, pe cât posibil, pierderea lor din motive exterioare experimentului, cum ar fi: canibalism, autoliză a țesuturilor sau greșeală de plasare a exemplarelor. La sfârșitul experimentului, se supun autopsiei toate animalele supraviețuitoare care aparțin loturilor nesatelit tratate. Animalele muribunde se scot imediat și se supun autopsiei.

Examinările următoare se efectuează de regulă asupra tuturor animalelor, inclusiv asupra martorilor:

(a) examenul oftalmologic, folosind un oftalmoscop sau un instrument echivalent corespunzător, trebuie făcut înainte de administrarea substanței de testat și la terminarea studiului, de preferință tuturor animalelor, dar cel puțin celor din lotul tratat cu doza mare și celor din lotul martor. Dacă se constată modificări oculare, se vor examina toate animalele;

(b) examenul hematologic, inclusiv hematocritul, concentrația hemoglobinei, numărul de hematii, numărul de leucocite și măsurători ale potențialului de coagulare, cum ar fi timpul de coagulare, timpul de protrombină, timpul de tromboplastină sau numărul de trombocite se măsoară la sfârșitul perioadei de testare;

(c) determinările biochimice clinice ale sângelui se realizează la sfârșitul perioadei de testare. Testele considerate caracteristice pentru toate studiile sunt: balanța electrolitică, metabolismul carbohidraților, funcția hepatică și renală. Alegerea unor determinări specifice depinde de observațiile asupra modului de acțiune a substanței de testat. Se pot sugera următoarele determinări: calciu, fosfor, clor, sodiu, potasiu, glucoza à jeun (cu privare de hrană pentru o perioadă caracteristică speciei), transaminaza serică glutamo-piruvică ([1]), transaminaza serică glutamo-oxaloacetică ([2]), ornitin decarboxilază, gama-glutamil transpetidaza, ureea, albumina, creatinina sanguină, bilirubina totală și proteinele totale.

Pentru o evaluare toxicologică adecvată pot fi necesare și alte determinări, care includ analizarea lipidelor, hormonilor, echilibrul acidobazic, methemoglobina și activitatea colinesterazică. Se pot efectua, dacă este necesar, și alte determinări biochimice clinice pentru a extinde investigațiile asupra efectelor observate;

(d) Nu este necesară efectuarea cu regularitate a analizei de urină, ci numai atunci când există o indicație bazată pe o toxicitate presupusă sau observată.

Dacă datele istorice de bază sunt insuficiente, înainte de începerea tratamentului trebuie să se determine parametrii hematologici și biochimici clinici.

Autopsia

Toate animalele supuse testului fac obiectul autopsiei generale, aceasta incluzând aspectul exterior al corpului, toate orificiile, cavitatea craniană, toracică și cea abdominală și conținutul acestora. Ficatul, rinichii, glandele suprarenale și testiculele trebuie cântărite în stare umedă, cât mai repede posibil după disecție, pentru a se evita deshidratarea. În vederea unor posibile examene histopatologice ulterioare, următoarele organe și țesuturi vor fi păstrate într-un mediu corespunzător: toate leziunile macroscopice, creier, inclusiv secțiuni prin bulb/punte, cortex cerebelos și cortex cerebral, glanda pituitară, tiroida/paratiroidele, țesut timic, traheea și plămânii, inimă, aortă, (glandele salivare), ficat, splină, rinichi, glande suprarenale, pancreas, gonade, uter (glande genitale anexe), (piele), esofag, stomac, duoden, jejun, ileon, cec, colon, rect, vezică urinară, ganglioni limfatici reprezentativi, (glanda mamară la femele), (musculatura coapsei), nervi periferici, stern cu măduvă osoasă, (ochi), (femur - incluzând articulația), (măduva spinării la trei niveluri – cervical, torace mediu și lombar) și (glande lacrimale extraorbitale). Țesuturile menționate între paranteze trebuie examinate doar atunci când acest lucru este indicat prin apariția semnelor de toxicitate sau implicarea organelor țintă.

Examenul histopatologic

(a) Se efectuează examen histopatologic complet pentru toate organele și țesuturile recoltate de la animalele din lotul martor și loturile expuse la doza maximă;

(b) Se examinează toate leziunile macroscopice;

(c) Se examinează organele-țintă ale animalelor din loturile expuse la celelalte doze;

(d) Se examinează histopatologic plămânii animalelor din lotul expus la doza minimă și la cea intermediară pentru a detecta infecțiile, deoarece acestea oferă o evaluare acceptabilă a stării de sănătate a animalelor. Trebuie să fie luată în considerare, de asemenea, examinarea histopatologică a ficatului și rinichiului în cazul acestor loturi. La animalele din aceste loturi nu se fac în mod curent examene histopatologice suplimentare, dar acestea trebuie făcute întotdeauna în cazul acelor organe pentru care s-au constatat leziuni la lotul expus la doza maximă;

(e) Atunci când este folosit un lot satelit, trebuie să se efectueze examene histopatologice pe țesuturile și organele pentru care s-au constatat leziuni la celelalte loturi tratate.

2. **REZULTATE**

Datele se sistematizează într-un tabel care indică, pentru fiecare lot de experiență, numărul de animale la începutul testului și numărul de animale care prezintă fiecare tip de leziune. Toate rezultatele observate se evaluează cu ajutorul unei metode statistice adecvate. Se poate folosi orice metodă statistică recunoscută.

([1]) În prezent cunoscută sub denumirea de alanin aminotransferază.
([2]) În prezent cunoscută sub denumirea de aspartat aminotransferază.

3. **RAPORT**

3.1. **Raport de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— specia, linia, originea, condițiile ambiante, regimul alimentar etc.;

— condițiile experimentale;

— dozele (inclusiv vehiculul, dacă este cazul) și concentrațiile;

— răspunsul toxic pe sexe și doză;

— dacă este posibil, nivelul care nu are nici un efect;

— momentul morții în timpul experimentului sau indicarea faptului că animalele au supraviețuit experimentului;

— efectele toxice sau de alt tip;

— momentul observării oricărui simptom anormal și evoluția acestuia;

— consumul de hrană și greutatea corporală;

— observațiile oftalmologice;

— examenele hematologice întreprinse și rezultatele complete;

— testele biochimice clinice practicate și rezultatele complete (inclusiv cele urinare);

— rezultatele autopsiei;

— descrierea detaliată a tuturor observațiilor histopatologice;

— tratarea statistică a rezultatelor, după caz;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare și interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

STUDIU DE TOXICITATE SUBCRONICĂ - ADMINISTRARE PRIN INHALARE

DOZĂ INHALATĂ ADMINISTRATĂ TIMP DE 90 DE ZILE UNOR SPECII ROZĂTOARE

1. METODĂ

1.1. Introducere

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. Definiții

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. Substanțe de referință

Nici una.

1.4. Principiul metodei de testare

SE EXPUN ZILNIC MAI MULTE LOTURI DE ANIMALE, PE PARCURSUL UNEI PERIOADE DETERMINATE, LA O SUBSTANȚĂ DE TESTAT ÎN CONCENTRAȚII CRESCĂTOARE, FIIND ADMINISTRATĂ O DOZĂ PE LOT TIMP DE 90 DE ZILE. CÂND SE FOLOSEȘTE UN VEHICUL ÎN VEDEREA OBȚINERII UNEI CONCENTRAȚII ADECVATE A SUBSTANȚEI DE TESTAT ÎN ATMOSFERĂ, SE PREVEDE UN LOT MARTOR PENTRU VEHICUL. PE PARCURSUL PERIOADEI DE ADMINISTRARE, SE OBSERVĂ ZILNIC ANIMALELE PENTRU A PUNE ÎN EVIDENȚĂ SIMPTOMELE DE TOXICITATE. ANIMALELE CARE MOR ÎN TIMPUL TESTULUI, PRECUM ȘI CELE CARE SUPRAVIEȚUIESC LA SFÂRȘITUL TESTULUI, SUNT SUPUSE AUTOPSIEI.

1.5. Criterii de calitate

Nici unul.

1.6. Descrierea metodei de testare

Pregătiri

Se țin animalele în condițiile de adăpostire și de alimentare specifice experimentului cel puțin în cele 5 zile care îl preced. Înainte de începerea testului, animalele tinere sănătoase se repartizează aleatoriu în loturi tratate și loturi martor. La nevoie, se poate adăuga la substanța de testat un vehicul adecvat în vederea obținerii unei concentrații corespunzătoare în atmosferă. Dacă, pentru a ușura administrarea, se folosește un vehicul sau alt tip de aditiv, acesta trebuie să fie netoxic. Pot fi folosite date istorice, dacă este necesar.

Condițiile de testare

Animale de experiență

Cu excepția contraindicațiilor, specia preferată este șobolanul. Se folosesc animale tinere, sănătoase, aparținând unei linii de laborator obișnuite. La începutul experimentului, diferența de greutate între animale nu trebuie să depășească cu mai mult de ± 20 % valoarea medie. Când studiul de toxicitate subcronică prin inhalare este efectuat ca fază preliminară a unui studiu pe termen lung, trebuie să se folosească aceeași specie și linie pentru ambele studii.

Număr și sex

Se folosesc cel puțin 20 de animale (10 femele și 10 masculi) pentru fiecare concentrație de expunere. Femelele trebuie să fie nulipare și negestante. Dacă se prevede sacrificarea unui număr de animale pe parcursul experimentului, acest număr se adaugă la total. De asemenea, se poate trata un lot satelit de 20 de animale (10 din fiecare sex) la doza maximă timp de 90 de zile, care poate fi supus observației cu privire la reversibilitatea, persistența sau apariția tardivă a efectelor toxice pe parcursul celor 28 zile care urmează tratamentului.

Concentrații de expunere

Cel puțin trei concentrații sunt necesare, precum și un lot martor sau, după caz, un lot martor pentru vehicul (corespunzând concentrației vehiculului la nivelul de expunere cel mai ridicat). Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, animalele din lotul martor se tratează în același mod ca și subiecții din loturile tratate. Concentrația maximă provoacă efecte toxice, dar nu trebuie să provoace sau provoacă rar moartea. Dacă există informații privind expunerea umană, concentrația minimă trebuie să fie superioară acestei valori. În condiții ideale, concentrația intermediară trebuie să producă efecte toxice minime observabile. Dacă se folosesc mai multe concentrații intermediare, acestea se administrează eșalonat, astfel încât să provoace o gradare a efectelor toxice. În loturile care corespund concentrațiilor mici și intermediare, precum și în lotul martor, incidența mortalității trebuie să fie mică, pentru a permite o evaluare semnificativă a rezultatelor.

Timpul de expunere

Expunerea zilnică trebuie să fie de 6 ore după echilibrarea concentrației în incinta experimentală. Se pot utiliza alte perioade de expunere pentru a răspunde unor cerințe specifice.

Echipament

Animalele se expun la substanța de testat cu ajutorul unui dispozitiv de inhalare conceput pentru a asigura un flux continuu sau cel puțin 12 aerisiri pe oră, garantând un conținut de oxigen adecvat și o distribuție uniformă a substanței de testat în aer. Dacă se folosește o incintă, aceasta trebuie concepută astfel încât să reducă la minim aglomerarea animalelor de experiență și să le asigure o expunere maximă, prin inhalare, a substanței de testat. De regulă, pentru a asigura stabilitatea atmosferei din incintă, volumul total al animalelor nu trebuie să depășească 5 % din volumul incintei. Se mai pot folosi expuneri oro-nazale, numai ale capului sau ale întregului corp, în incinte individuale; primele două tipuri de expunere limitează absorbția pe alte căi a substanței de testat.

Perioada de observație

Se observă toate animalele zilnic în vederea notării simptomelor de toxicitate, pe tot parcursul perioadei de tratare și de refacere. Se consemnează momentul morții și momentul când apar și dispar simptomele de toxicitate.

Mod de operare

Se expun zilnic animalele la substanța de testat timp de cinci până la șapte zile pe săptămână, pe o perioadă de 90 de zile. Animale aparținând loturilor satelit prevăzute pentru observații ulterioare se țin sub observație încă 28 zile, fără tratament, pentru a studia vindecarea sau persistența efectelor toxice. Temperatura la care are loc testul se menține la 22 °C ± 3 °C. În condiții optime, umiditatea relativă se menține între 30 și 70 % dar, în anumite cazuri, acest lucru poate fi imposibil (de exemplu, în cazul testelor cu aerosoli). Pe parcursul perioadei de expunere, nu se administrează animalelor nici hrană, nici apă.

Se folosește un sistem de inhalare dinamic, prevăzut cu un dispozitiv adecvat de control analitic al concentrației. Pentru determinarea concentrațiilor de expunere adecvate, se recomandă să se procedeze la un test preliminar. Se ajustează debitul de aer pentru a asigura concentrații omogene în toată incinta. Sistemul trebuie să permită obținerea unor condiții de expunere stabile cât de rapid posibil.

Se măsoară și se controlează:

(a) debitul de aer (în permanență);

(b) concentrația reală a substanței măsurate în zona de respirație. Pe parcursul perioadei de expunere zilnică, concentrația nu trebuie să varieze cu mai mult de ± 15 % față de valoarea medie. Cu toate acestea, în cazul prafului și al aerosolilor, acest grad de control poate să nu fie atins, iar în acest caz se poate accepta o diferență mai mare. Pe durata experimentului concentrațiile administrate zilnic trebuie menținute la valori cât de constante posibil. Pe durata generării aerosolilor trebuie efectuată analiza granulometrică pentru a determina stabilitatea concentrației acestora. În timpul expunerii, analiza trebuie efectuată suficient de des pentru a determina măsura în care distribuția particulelor este constantă;

(c) temperatura și umiditatea;

(d) în timpul expunerii și după aceasta au loc observații care sunt înregistrate sistematic; pentru fiecare animal se consemnează date individuale. Se observă zilnic toate animalele și se înregistrează simptomele de toxicitate, precum și momentul apariției, intensitatea și durata acestora. Observația zilnică în cușcă vizează, între altele, modificări ale pielii și ale blănii, ale ochilor și ale mucoaselor, ale aparatului respirator, ale sistemului circulator, ale sistemului nervos autonom și central, precum și ale activității somato-motrice și ale comportamentului. Se determină săptămânal consumul de hrană și greutatea animalelor. Animalele sunt observate cu regularitate, pentru a evita pe cât posibil pierderea lor din motive exterioare experimentului, cum ar fi: canibalism, autoliză a țesuturilor sau greșeală de plasare a exemplarelor. La sfârșitul perioadei de expunere, se supun autopsiei toate animalele supraviețuitoare. Animalele muribunde sunt retrase imediat și supuse autopsiei.

Examinările următoare se efectuează de regulă asupra tuturor animalelor, inclusiv asupra martorilor:

(a) examenul oftalmologic, folosind un oftalmoscop sau un instrument echivalent corespunzător, trebuie făcut înainte de administrarea substanței de testat și la terminarea studiului, de preferință tuturor animalelor, dar cel puțin celor din lotul tratat cu doza cea mai mare și din lotul martor. Dacă se constată modificări oculare, se vor examina toate animalele;

(b) examenul hematologic, inclusiv hematocritul, concentrația hemoglobinei, numărul de hematii, numărul de leucocite și măsurători ale potențialului de coagulare, cum ar fi timpul de coagulare, timpul de protrombină, timpul de tromboplastină sau numărul de trombocite se măsoară la sfârșitul perioadei de testare;

(c) determinările biochimice clinice ale sângelui se realizează la sfârșitul perioadei de testare. Testele considerate caracteristice pentru toate studiile sunt: balanța electrolitică, metabolismul carbohidraților, funcția hepatică și renală. Alegerea unor determinări specifice depinde de observațiile asupra modului de acțiune a substanței de testat. Se pot sugera următoarele determinări: calciu, fosfor, clor, sodiu, potasiu, glucoza à jeun (cu privare de hrană pentru o perioadă caracteristică speciei), transaminaza serică glutamo-piruvică ([1]), transaminaza serică glutamo-oxaloacetică ([2]), ornitin decarboxilază, gama-glutamil transpetidaza, ureea, albumina, creatinina sanguină, bilirubina totală și proteinele totale. Pentru o evaluare toxicologică adecvată pot fi necesare și alte determinări, care includ analizarea lipidelor, hormonilor, echilibrul acidobazic, methemoglobina și activitatea colinesterazică. Se pot efectua, dacă este necesar, și alte determinări biochimice clinice pentru a extinde investigațiile asupra efectelor observate;

(d) Nu este necesară efectuarea cu regularitate a analizei de urină, ci numai atunci când există o indicație bazată pe o toxicitate presupusă sau observată.

Dacă datele istorice de bază sunt insuficiente, înainte de începerea tratamentului trebuie să se determine parametrii hematologici și biochimici clinici.

Autopsia

Toate animalele supuse testului fac obiectul autopsiei generale, aceasta incluzând aspectul exterior al corpului, toate orificiile, cavitatea craniană, toracică și cea abdominală și conținutul acestora. Ficatul, rinichii, glandele suprarenale și testiculele trebuie cântărite în stare umedă, cât mai repede posibil după disecție, pentru a se evita deshidratarea. În vederea unor posibile examene histopatologice ulterioare, următoarele organe și țesuturi vor fi păstrate într-un mediu corespunzător: toate leziunile macroscopice, plămânii – care trebuie scoși intacți, cântăriți și tratați cu un fixator potrivit care permite conservarea structurii pulmonare (se consideră că perfuzia cu acest fixator este o metodă eficientă), țesuturile nazo-faringiene, creierul - inclusiv secțiuni prin bulb/punte, cortex cerebelos și cortex cerebral, glanda pituitară, tiroida/paratiroidele, țesutul timic, traheea și plămânii, inima, aorta, (glandele salivare), ficatul, splina, rinichii, glandele suprarenale, pancreasul, gonadele, uterul (glandele genitale anexe), (pielea), esofagul, stomacul, duodenul, jejunul, ileonul, cecul, colonul, rectul, vezica urinară, ganglionii limfatici reprezentativi, (glanda mamară la femele), (musculatura coapsei), nervii periferici, (ochii), sternul cu măduvă osoasă, (femurul, inclusiv articulația), (măduva spinării la trei niveluri – cervical, torace mediu și lombar) și (glande lacrimale extraorbitale). Țesuturile menționate între paranteze trebuie examinate doar atunci când acest lucru este indicat prin apariția semnelor de toxicitate sau implicarea organelor țintă.

Examenul histopatologic

(a) Se efectuează examen histopatologic complet pentru tractul respirator și alte organe și țesuturi recoltate de la animalele din lotul martor și loturile expuse la doza cea mai mare;

(b) Se examinează toate leziunile macroscopice;

(c) Se examinează organele-țintă ale animalelor din loturile expuse la celelalte doze;

(d) Se examinează histopatologic plămânii animalelor din lotul expus la doza mică și la cea intermediară, urmărind detectarea infecțiilor, deoarece acestea oferă o evaluare acceptabilă a stării de sănătate a animalelor. La animalele din aceste loturi nu se fac în mod curent examene histopatologice suplimentare, dar acestea trebuie făcute întotdeauna în cazul acelor organe pentru care s-au constat leziuni la lotul expus la doza cea mai mare;

(e) Atunci când este folosit un lot satelit, trebuie să se efectueze examene histopatologice pe țesuturile și organele pentru care s-au constatat leziuni la celelalte loturi tratate.

([1]) În prezent cunoscută sub denumirea de alanin aminotransferază.
([2]) În prezent cunoscută sub denumirea de aspartat aminotransferază.

2. **REZULTATE**

Datele se sistematizează într-un tabel care indică, pentru fiecare lot de experiență, numărul de animale la începutul testului și numărul de animale care prezintă fiecare tip de leziune. Toate rezultatele observate se evaluează cu ajutorul unei metode statistice adecvate. Se poate folosi orice metodă statistică recunoscută.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— specia, linia, originea, condițiile ambiante, regimul alimentar etc.;

— condițiile experimentale:

Descrierea aparatului de expunere: inclusiv concepția, tipul, dimensiunile, sursa de aer, sistemul generator de particule și de aerosoli, metoda de condiționare a aerului, tratarea aerului expirat și, după caz, modul de adăpostire a animalelor în incinta de testare. Se descrie echipamentul folosit pentru măsurarea temperaturii și, dacă este necesar, stabilitatea concentrațiilor de aerosoli și granulometria particulelor.

Datele privind expunerea: se prezintă sub forma unui tabel care indică valorile medii, precum și măsura variabilității (de exemplu, deviația standard); ele trebuie să includă:

(a) debitul de aer în dispozitivul de inhalare;

(b) temperatura și umiditatea aerului;

(c) concentrațiile nominale (cantitatea totală de substanță de testat introdusă în dispozitivul de inhalare raportată la volumul de aer);

(d) după caz, natura vehiculului;

(e) concentrațiile reale din zona de respirație;

(f) dimensiunile mediane ale particulelor (după caz);

— răspunsul toxic pe sexe și concentrație;

— dacă este posibil, nivelul care nu are nici un efect;

— momentul morții în timpul experimentului sau indicarea faptului că animalele au supraviețuit experimentului;

— efectele toxice sau de alt tip;

— momentul observării oricărui simptom anormal și evoluția acestuia;

— consumul de hrană și greutatea corporală;

— observații oftalmologice;

— examenele hematologice întreprinse și rezultatele complete;

— testele biochimice clinice practicate și rezultatele complete (inclusiv cele urinare);

— rezultatele autopsiei;

— descrierea detaliată a tuturor observațiilor histopatologice;

— tratarea statistică a rezultatelor, după caz;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare și interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

STUDIU DE TERATOGENEZĂ – ROZĂTOARE ȘI NEROZĂTOARE

1. METODĂ

1.1. Introducere

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. Definiții

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. Substanțe de referință

NICI UNA.

1.4. Principiul metodei de testare

Substanța de testat este administrată în doze sau concentrații crescătoare, pe mai multe loturi de femele gestante cel puțin în acea parte a sarcinii care acoperă perioada de organogeneză, o doză pentru fiecare lot. Cu puțin timp înainte de data presupusă a fătării, femelele sunt sacrificate, se prelevează uterul și se examinează conținutul. Această metodă de testare acoperă perioadele de embriotoxicitate și fetotoxicitate.

1.5. Criterii de calitate

Nici unul.

1.6. Descrierea metodei de testare

Pregătiri

Femelele tinere adulte și virgine, de vârstă și greutate apropiată, sunt aclimatizate în condițiile de laborator cu cel puțin cinci zile înainte de începerea testării, apoi sunt împerecheate cu masculi a căror fertilitate a fost stabilită în mod cert. Femelele inseminate sunt repartizate aleatoriu în loturile de tratament.

Împerecherea se poate face pe căi naturale sau prin inseminare artificială. Substanța de testat este administrată zilnic la femele, imediat după implantare și continuând pe toată perioada de organogeneză. Cu o zi înainte de termen se procedează la histerectomie, iar fetușii sunt examinați cu privire la malformații viscerale sau ale scheletului, inclusiv întârzieri ale creșterii, osificare întârziată și hemoragii intestinale.

Condiții experimentale

Animale de experiență

Speciile folosite în mod obișnuit sunt: șobolanul, șoarecele, hamsterul și iepurele. Speciile preferate sunt șobolanul și iepurele. Se folosesc animale aparținând unei linii de laborator obișnuite. Linia nu trebuie să aibă o fertilitate scăzută și trebuie să fie caracterizată prin reacția la agenți teratogeni. Animalele se pun în cuști individuale.

Număr și sex

Pentru fiecare doză este necesar un număr de cel puțin 20 femele șobolani, șoareci sau hamsteri gestante sau 12 femele iepuri gestante. Obiectivul este de a se asigura un număr suficient de pui pentru a se permite o evaluare a teratogenezei al substanței.

Doze

Se folosesc cel puțin trei doze și un martor. Când substanța de testat se administrează într-un vehicul, este, de asemenea, necesar un lot martor pentru vehicul. Dacă se folosește un vehicul trebuie să se cunoască proprietățile sale toxicologice; acesta nu trebuie să fie teratogen sau să aibă efecte asupra reproducerii. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, animalele din lotul martor se tratează în același mod ca și subiecții din loturile tratate. Exceptând cazurile în care intervin proprietățile biologice și cele fizico-chimice ale substanței,

ideal este ca doza maximă să inducă semne evidente de toxicitate maternă, cum ar fi scăderea în greutate, dar mortalitatea maternă nu trebuie să fie mai mare de 10 %. Doza minimă nu trebuie să inducă efecte observabile care pot fi atribuite substanței de testat. Doza sau dozele intermediare trebuie să se situeze geometric între doza maximă și doza minimă.

Test limită

În cazul substanțelor cu toxicitate scăzută, dacă o doză de cel puțin 1000 mg/kg nu produce efecte asupra embriogenezei și a teratogenezei, continuarea experienței poate fi inutilă.

Durata tratamentului

Ziua „0" a testului este ziua în care se observă prezența dopului vaginal și/sau spermei în vagin (când este posibil). Perioada de tratament trebuie să acopere maximum din perioada de organogeneză. Tratamentul se efectuează între zilele 6 și 15 la șobolani și șoareci, 6 și 14 la hamsteri, 6 și 18 la iepure. Dacă ziua 0 se stabilește prin observarea împerecherii sau în funcție de ziua inseminării artificiale, etapele de tratament trebuie ajustate adăugând încă o zi. Alternativ, perioada de tratament se poate prelungi cu aproximativ o zi înainte de data presupusă a fătării.

Perioada de observație

Cel puțin o dată pe zi se efectuează o examinare clinică atentă. Se efectuează zilnic observații suplimentare și se iau măsurile corespunzătoare pentru a reduce la minim pierderea de animale pentru studiu.

Mod de operare

Substanța de testat este administrată oral, prin gavaj. Substanța se administrează aproximativ la aceeași oră în fiecare zi.

Femelele din experiment sunt tratate cu substanța de testat zilnic pe toată durata corespunzătoare tratamentului. Doza trebuie să fie în funcție de greutatea femelelor la începutul administrării tratamentului sau, alternativ, date fiind modificările din timpul gestației când greutatea corporală crește foarte rapid, animalele trebuie cântărite periodic iar doza trebuie ajustată în funcție de cea mai recentă greutate stabilită. Semnele de toxicitate se consemnează pe măsură ce sunt observate, specificându-se timpul apariției, intensitatea și durata lor. Femelele care prezintă semne de avort sau fătare prematură trebuie sacrificate și examinate macroscopic. Observațiile se efectuează și după încheierea tratamentului până la aproximativ o zi înainte de termenul fătării, astfel încât să acopere cea mai mare perioadă a gestației, evitându-se în același timp interpretarea eronată a rezultatelor care poate apărea după fătarea pe cale naturală. Observațiile zilnice în cușcă urmăresc mai ales modificările pielii și blănii, ale ochilor și mucoaselor, ale aparatului respirator, ale sistemului circulator, ale sistemului nervos central și autonom, precum și ale activității somato-motrice și ale comportamentului. Săptămânal se măsoară consumul de hrană. Animalele se cântăresc săptămânal.

Autopsia

În cazul deceselor înregistrate pe parcursul desfășurării experimentului sau la sfârșitul acestuia, femelele trebuie examinate macroscopic pentru a decela malformațiile sau modificările patologice care ar fi putut influența gestația. Imediat după deces, se îndepărtează uterul și se examinează conținutul pentru a constata moartea embrionilor sau a fetilor și numărul de feți vii. De obicei, este posibil să se estimeze momentul morții *in utero*. La șobolani și iepuri se poate determina numărul *corpora lutea*. Se va stabili sexul fetilor, se vor cântări individual și se va calcula media greutății fetilor din aceeași serie. După îndepărtare, fiecare făt trebuie să fie examinat din punct de vedere al aspectului exterior. La șobolani, șoareci și hamsteri, între o treime și o jumătate din pui sunt pregătiți și examinați pentru a se determina anomaliile scheletului; restul puilor fiind pregătiți și examinați pentru a se determina anomaliile țesuturilor moi prin metode corespunzătoare. La iepuri fiecare făt trebuie examinat atent prin disecție, pentru a se determina anomaliile viscerale și apoi anomaliile scheletului.

2. **REZULTATE**

Datele se sistematizează în tabele, indicând pentru fiecare lot numărul inițial de animale, numărul gestantelor, numărul și procentul de feți vii și al celor cu anomalii ale țesuturilor moi sau ale scheletului, făcându-se comparația cu martorul obișnuit al speciei. Datele se evaluează printr-o metodă statistică adecvată. Poate fi folosită orice metodă statistică recunoscută.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— specia, linia, sursa, condiții de mediu, regimul alimentar;

— condițiile experimentale;

— dozele (inclusiv vehiculul, dacă este cazul) și concentrațiile;

— date despre răspunsul toxic pe doze;

— nivelul care nu produce efecte, dacă este posibil;

— momentul deceselor în perioada experimentului sau dacă animalele au supraviețuit până la sfârșit;

— descrierea toxicității sau a altor efecte;

— momentul observării oricărui semn anormal și evoluția ulterioară a acestora;

— date despre hrană și greutate corporală;

— durata sarcinii și date despre puii fătați (inclusiv date din studii anterioare);

— date despre feți (vii/morți, sex, deficiențe ale țesuturilor moi și deficiențe ale scheletului);

— date despre pui (vii/morți, sex, deficiențe ale țesuturilor moi și deficiențe ale scheletului pentru fiecare pui);

— tratarea statistică a rezultatelor;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

4. **Evaluare și interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

5. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

STUDIU DE TOXICITATE CRONICĂ

1. **METODĂ**

1.1. **Introducere**

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. **Definiții**

A se vedea introducerea generală, partea B

1.3. **Substanțe de referință**

Nici una.

1.4. **Principiul metodei de testare**

Substanța de testat se administrează în mod normal pe mai multe loturi de animale de experiență, câte o doză pe lot, pe o cale de administrare convenabilă, șapte zile pe săptămână, pe o perioadă îndelungată din viața lor. Pe parcursul expunerii și după expunere la substanța de testat, animalele de experiență sunt ținute sub observație zilnic pentru a depista semnele de toxicitate.

1.5. **Criterii de calitate.**

Nici unul.

1.6. **Descrierea metodei**

Pregătirea testului

Animalele se țin în condițiile de adăpostire și de alimentare specifice experimentului în cel puțin cele 5 zile care îl preced. Înainte de începerea testului, animalele tinere sănătoase se repartizează aleatoriu în loturile tratate și loturile martor.

Condiții experimentale

Animale de experiență

Specia preferată este șobolanul. În funcție de rezultatele obținute din studiile anterioare, pot fi folosite și alte specii (rozătoare sau nerozătoare). Se folosesc animale tinere și sănătoase aparținând unei linii de laborator obișnuite, iar tratamentul trebuie să înceapă cât mai repede după înțărcare.

La începutul studiului, diferența de greutate între animale nu trebuie să depășească cu mai mult de ± 20 % valoarea medie. Când se efectuează un studiu de toxicitate subcronică prin administrare orală în faza pregătitoare a unui studiu pe termen lung, trebuie să se folosească aceeași specie și linie pentru ambele studii.

Număr și sex

În cazul rozătoarelor, se utilizează cel puțin 40 de animale (20 femele și 20 masculi) pentru fiecare doză și pentru fiecare lot martor. Femelele trebuie să fie nulipare și negestante. Dacă se prevede sacrificarea unui număr de animale pe parcursul experimentului, acest număr se adaugă la total.

În cazul nerozătoarelor, se acceptă un număr mai mic de animale, însă nu mai puțin de patru din fiecare sex pentru fiecare lot.

Doze și frecvența expunerii

Pe lângă lotul martor pregătit în simultan, se folosesc cel puțin trei doze. Doza maximă trebuie să producă efecte evidente de toxicitate fără a produce mortalitate excesivă. Doza minimă nu trebuie să producă o toxicitate evidentă.

Doza sau dozele intermediare trebuie să aibă o valoare apropiată de media dozelor maximă și minimă.

Alegerea dozelor trebuie să ia în considerare datele obținute în studiile de toxicitate precedente.

În mod normal, expunerea este zilnică. Dacă substanța se administrează în apa de băut sau în hrană, animalele trebuie să aibă acces permanent la acestea.

Martori

Se recomandă folosirea unui lot martor identic din toate punctele de vedere cu loturile tratate, cu excepția expunerii la substanța de testat.

În circumstanțe speciale, cum ar fi studiile de toxicitate prin inhalare care presupun folosirea aerosolilor sau folosirea unui emulsifiant cu activitate biologică necunoscută în studii orale, se impune folosirea unui lot martor negativ. Lotul martor negativ este tratat în aceleași condiții ca loturile testate, exceptând faptul că animalele nu sunt expuse la substanța de testat sau la vreun vehicul.

Calea de administrare

Cele două căi principale de administrare sunt cea orală și prin inhalare. Alegerea căii de administrare depinde de caracteristicile fizice și chimice ale substanței de testat și de calea probabilă de expunere a oamenilor.

Folosirea căii cutanate de administrare ridică probleme practice considerabile. Toxicitatea cronică sistemică rezultată în urma absorbției percutanate se poate deduce, în mod normal, din rezultatele unui alt test cu administrare orală; informații asupra cantității de substanță absorbită pe cale percutanată pot fi obținute pe baza testelor precedente de toxicitate cu administrare percutanată.

Studii prin administrare orală

Dacă substanța de testat se absoarbe prin tractul gastro-intestinal și dacă ingestia este una din posibilele căi de expunere la om, atunci este preferată calea de administrare orală, exceptând cazurile în care aceasta este contraindicată.

Animalele pot primi substanța în hrană, dizolvată în apa de băut sau sub formă de capsule.

În mod ideal, doza trebuie administrată zilnic, șapte zile pe săptămână, deoarece dozarea de cinci zile pe săptămână face posibilă remiterea sau diminuarea toxicității în perioada de pauză, astfel încât ar putea fi afectate rezultatele și evaluările ulterioare. Cu toate acestea, din considerente practice, poate fi acceptată dozarea de cinci zile pe săptămână.

Studii de toxicitate prin inhalare

Deoarece studiile de toxicitate prin inhalare ridică probleme tehnice de o mai mare complexitate în comparație cu celelalte căi de administrare, în cele ce urmează se prezintă îndrumări detaliate privind acest mod de administrare. Trebuie remarcat că în anumite situații o alternativă viabilă o constituie instilațiile intratraheale.

Expunerile pe termen lung se modelează de obicei după posibila expunere a omului: substanța se administrează fie zilnic, timp de 6 ore, după echilibrarea concentrației în incintă, câte cinci zile pe săptămână (expunere intermitentă), fie, dacă se urmăresc efectele unei posibile expuneri în mediul înconjurător, timp de 22 – 24 ore/zi, câte șapte zile pe săptămână (expunere continuă), în acest ultim caz cu pauză de o oră/zi pentru hrănirea animalelor, în același moment al zilei și menținând condițiile specifice din incintă. În ambele cazuri, animalele sunt expuse de obicei la concentrații constante de substanță. Diferența esențială dintre expunerea intermitentă și cea continuă este aceea că în primul caz există o perioadă de 17 –18 ore în care animalele se pot reface după efectele fiecărei expuneri zilnice, refacere chiar mai îndelungată la sfârșit de săptămână.

Alegerea modalității de expunere - intermitentă sau continuă - depinde de obiectivele studiului și de tipul de expunere umană simulat. Cu toate acestea, trebuie avute în vedere anumite dificultăți tehnice. De exemplu, avantajul expunerii continue prin simularea condițiilor de mediu este contrabalansat de cerința hrănirii și adăpării animalelor în timpul expunerii și de necesitatea de a dispune de tehnici mai complicate (și mai fiabile) atât de generare a aerosolilor și a vaporilor, cât și de monitorizare.

Incinte de testare

Animalele se expun la substanța de testat în incinte de inhalare concepute pentru a asigura un flux continuu sau cel puțin 12 aerisiri pe oră, garantând un conținut de oxigen adecvat și o distribuție uniformă a produsului de testat în aer. Incinta martor și cea de testare trebuie să fie identice ca proiectare și construcție, astfel încât să asigure condiții comparabile sub toate aspectele, cu excepția expunerii la substanțele testate. În incintă se menține o presiune ușor negativă pentru a împiedica pierderea substanței de testat în zona înconjurătoare. În incinte trebuie redusă la minim aglomerarea animalelor testate De regulă, pentru a asigura stabilitatea atmosferei din incintă, volumul total al animalelor nu trebuie să depășească 5 % din volumul incintei.

Se măsoară și se controlează:

(i) fluxul de aer: debitul de aer în incintă este, de preferință, monitorizat continuu;

(ii) concentrația: pe parcursul expunerii zilnice, concentrația substanței de testat nu trebuie să varieze cu mai mult de ± 15 % din valoarea medie;

(iii) temperatura și umiditatea: în cazul rozătoarelor, temperatura trebuie menținută la 22 ± 2 °C, iar umiditatea din incintă la 30 – 70 %, exceptând cazurile în care se folosește apă ca mediu de suspensie pentru substanța de testat în atmosfera incintei (aerosoli). De preferință, ambii parametri trebuie să fie monitorizați continuu;

(iv) analiza granulometrică a particulelor: în atmosfera incintei unde există aerosoli lichizi sau solizi, trebuie să fie determinată distribuția granulometrică a particulelor. Particulele din componența aerosolilor trebuie să aibă o dimensiune respirabilă pentru animalele testate. Probele din atmosfera incintei se prelevează de la nivelul zonei de respirație. Probele de aer trebuie să fie reprezentative din punct de vedere al distribuției particulelor la care sunt expuse animalele și trebuie să reflecte, în termeni gravimetrici, toate suspensiile de tip aerosol, chiar dacă o mare parte din acestea nu sunt respirabile. Pe durata generării aerosolilor trebuie efectuată analiza granulometrică pentru a determina stabilitatea concentrației acestora și, ulterior, ori de câte ori este necesar în timpul expunerii, a determina măsura în care este constantă distribuția particulelor la care au fost expuse animalele.

Durata studiului

Durata administrării trebuie să fie de cel puțin 12 luni.

Mod de operare

Observații

Se efectuează zilnic o examinare clinică amănunțită. După caz, se fac zilnic observații suplimentare și se iau măsuri în consecință pentru a reduce la minim pierderea animalelor din motive exterioare testului, cum ar fi autopsierea sau congelarea animalelor găsite moarte sau izolarea sau sacrificarea celor bolnave sau muribunde. Este necesară observarea detaliată a animalelor pentru a detecta declanșarea și evoluția tuturor efectelor toxice, precum și pentru a reduce la minim pierderile datorate bolilor, autolizei sau canibalismului.

Pentru toate animalele se înregistrează semnele clinice, inclusiv modificările neurologice și oculare, și mortalitatea. Se înregistrează momentul apariției efectelor toxice și evoluția acestora, inclusiv tumorile suspecte.

Greutatea fiecărui animal se înregistrează săptămânal în primele 13 săptămâni de studiu și, ulterior, cel puțin o dată la fiecare 4 săptămâni. Consumul de hrană se determină săptămânal în primele 13 săptămâni de studiu, apoi la intervale de aproximativ trei luni, exceptând cazurile în care starea de sănătate și greutatea corporală a animalelor impun alte intervale.

Examene hematologice

Examenele hematologice (de ex. hemoglobina, hematocritul, numărul hematiilor, numărul leucocitelor, trombocitele sau alte măsurători ale potențialului de coagulare) trebuie efectuate la trei luni, șase luni, apoi la intervale de șase luni, iar la sfârșitul studiului se recoltează probe de sânge de la toate nerozătoarele și de la câte 10 șobolani/sex din toate loturile. Dacă este posibil, probele se prelevează de fiecare dată de la aceiași șobolani. În plus, la nerozătoare se recoltează probe de sânge și înainte de începerea experimentului.

Dacă observațiile clinice sugerează o deteriorare a stării de sănătate a animalelor pe parcursul studiului, se stabilește formula leucocitară a fiecărui animal afectat.

Se determină formula leucocitară pe probe prelevate de la animalele aparținând lotului expus la doza maximă și lotului martor. Această formulă nu se determină pentru loturile expuse la doze imediat mai mici decât dacă se constată o discrepanță între loturile expuse la doza maximă și loturile martor sau dacă examenul patologic indică acest lucru.

Analiza urinei

Trebuie colectate probe de urină de la toate nerozătoarele și de la câte 10 șobolani/sex din toate loturile, dacă este posibil de la aceiași șobolani și la aceleași intervale de timp ca probele de sânge necesare efectuării examenelor hematologice. Pentru fiecare animal sau pe o probă colectată de la mai multe animale rozătoare, de același sex, din același lot, se fac următoarele determinări:

— aspect: volum și densitate pentru fiecare animal;

— proteine, glucoză, corpi cetonici, hemoragii oculte (semicantitativ);

— microscopia sedimentului (semicantitativ).

Biochimie clinică

La intervale de aproximativ 6 luni, precum și la sfârșitul experimentului, se recoltează probe de sânge pentru determinări biochimice de la toate animalele nerozătoare și de la câte 10 șobolani/sex din toate loturile, dacă este posibil de fiecare dată de la aceiași șobolani. În plus, de la nerozătoare trebuie să se recolteze probe înaintea testului. Pe plasma obținută din aceste probe se vor efectua următoarele determinări:

— concentrația proteinelor totale;

— concentrația albuminelor;

— teste ale funcției hepatice: activitatea fosfatazei alcaline, transaminază glutampiruvică ([1]) transaminază oxalacetică ([2]), gamma glutamil transpeptidază, ornitin decarboxilază;

— metabolismul carbohidraților, cum ar fi glucoza à jeun;

— explorarea funcției renale, cum ar fi azotul ureic din sânge.

Autopsia

Se efectuează autopsia generală a tuturor animalelor, inclusiv a celor care mor pe parcursul experimentului sau care au fost sacrificate, fiind muribunde. Înainte de sacrificare, se prelevează probe de sânge de la toate animalele, pentru formula leucocitară. Se conservă toate leziunile macroscopice, tumorile sau leziunile suspecte de a deveni tumori. Se procedează la corelarea observațiilor macroscopice cu rezultatele microscopice.

Toate organele și țesuturile trebuie conservate într-un mediu corespunzător în vederea examenului histopatologic. De obicei, sunt vizate următoarele organe și țesuturi: creier ([3]) (bulb rahidian, punte, cortex cerebelos și cortex cerebral), glanda pituitară, tiroida (inclusiv paratiroida), timus, plămâni (inclusiv trahee), inimă, aortă, glandele salivare, ficat ([3]), splină, rinichi ([3]), glandele suprarenale ([3]), esofag, stomac, duoden, jejun, ileon, cec, colon, rect, uter, vezica urinară, ganglionii limfatici, pancreas, gonade ([3]), organe genitale anexe, glandele mamare feminine, piele, mușchi, nervi periferici, măduva spinării (cervicală, toracică, lombară) stern cu măduvă și femur (inclusiv articulația) și ochi. Umplerea plămânilor și a vezicii urinare cu fixator prezintă modalitatea optimă de conservarea a acestora; în studiile de toxicitate prin inhalare, umplerea plămânilor este o cerință esențială pentru examinarea histopatologică adecvată. În cazul acestor studii, întregul tract respirator trebuie conservat, inclusiv cavitatea nazală, faringele și laringele.

Dacă se realizează și alte examinări clinice, informațiile obținute din aceste studii trebuie să fie disponibile înainte de examinarea microscopică, deoarece pot să dea indicii medicului patolog.

Examen histopatologic

Se examinează microscopic toate modificările vizibile, în special tumorile și alte tipuri de leziuni ce apar la nivelul oricărui organ. De asemenea se recomandă efectuarea următoarelor examinări:

(a) examinarea microscopică a tuturor organelor și țesuturilor conservate, cu descrierea completă a leziunilor evidențiate la:

   1. toate animalele care au murit sau au fost sacrificate pe parcursul studiului;

   2. toate animalele din loturile martor și din loturile tratate cu doza maximă.

(b) de asemenea, sunt examinate organele și țesuturile care prezintă modificări induse sau posibil induse de substanța de testat la loturile tratate cu doze mai mici;

(c) dacă rezultatul testului indică reducerea substanțială a vieții animalelor sau inducerea unor efecte ce pot afecta răspunsul toxic, atunci se examinează microscopic și lotul tratat cu doza imediat mai mică;

(d) informațiile privind incidența leziunilor care apar în mod normal la linia de animal folosită, în aceleași condiții de laborator, adică date istorice pentru martori, sunt indispensabile pentru evaluarea corectă a importanței modificărilor observate la animalele tratate.

([1]) În prezent cunoscută sub denumirea de alanin aminotransferază.

([2]) În prezent cunoscută sub denumirea de aspartat aminotransferază.

([3]) Aceste organe se recoltează de la 10 animale/sex/lot în cazul rozătoarelor, plus tiroida (cu paratiroidele) în cazul tuturor nerozătoareleor și se cântăresc.

2. **REZULTATE**

Datele se sistematizează în tabele care să indice pentru fiecare lot numărul inițial de animale, numărul de animale care prezintă leziuni și procentul de animale pentru fiecare tip de leziune. Rezultatele se evaluează cu ajutorul unei metode statistice adecvate. Se poate folosi orice metodă statistică recunoscută.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— specia, linia, originea, condițiile ambiante, regimul alimentar etc.;

— condițiile experimentale:

Descrierea aparatului de expunere:

inclusiv concepția, tipul, dimensiunile, sursa de aer, sistemul generator de particule și de aerosoli, metoda de condiționare a aerului, tratarea aerului expirat și, după caz, modul de adăpostire a animalelor în incinta de testare. Se descrie echipamentul folosit pentru măsurarea temperaturii și, dacă este necesar, stabilitatea concentrațiilor de aerosoli și granulometria particulelor.

Datele privind expunerea:

se prezintă sub forma unui tabel care indică valorile medii, precum și măsura variabilității (de exemplu, deviația standard); ele trebuie să includă:

(a) debitul de aer în dispozitivul de inhalare;

(b) temperatura și umiditatea aerului;

(c) concentrațiile nominale (cantitatea totală de substanță de testat introdusă în dispozitivul de inhalare raportată la volumul de aer);

(d) după caz, natura vehiculului;

(e) concentrațiile reale din zona de respirație;

(f) dimensiunile mediane ale particulelor (după caz);

— dozele (inclusiv vehiculul, dacă este cazul) și concentrațiile;

— răspunsul toxic pe sexe și doză;

— doza la care nu apar efecte;

— momentul morții în timpul experimentului sau indicarea faptului că animalele au supraviețuit experimentului;

— efectele toxice sau de alt tip;

— momentul observării fiecărui simptom anormal și evoluția acestuia;

— consumul de hrană și greutatea corporală;

— observațiile oftalmologice;

— examenele hematologice întreprinse și rezultatele complete;

— testele biochimice clinice practicate și rezultatele complete (inclusiv cele urinare);

— rezultatele autopsiei;

— descrierea detaliată a tuturor observațiilor histopatologice;

— tratarea statistică a rezultatelor, după caz;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare și interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

STUDIU DE CANCEROGENEZĂ

1. METODĂ

1.1. Introducere

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. Definiții

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. Substanțe de referință

Nu există.

1.4. Principiul metodei de testare

Substanța de testat se administrează în mod normal șapte zile pe săptămână, pe o cale adecvată, o doză pe lot, la mai multe loturi de animale de experiență, pe o perioadă semnificativă din viața acestora. Pe parcursul expunerii și după expunere la substanța de testat, animalele de experiență sunt ținute sub observație zilnic pentru a detecta semnele de toxicitate, în special formarea tumorilor.

1.5. Criterii de calitate

Nici unul.

1.6. Descrierea metodei

Animalele se țin în condițiile de adăpostire și de alimentare specifice experimentului cel puțin în cele 5 zile care îl preced. Înainte de începerea testului, animalele tinere sănătoase se repartizează aleatoriu în loturi tratate și loturi martor.

Animale de experiență

Specia preferată este șobolanul. În funcție de rezultatele studiilor anterioare, pot fi folosite alte specii (rozătoare sau nerozătoare). Se folosesc animale tinere, sănătoase, aparținând unei linii de laborator obișnuite și administrarea dozei începe cât mai curând după înțărcare.

La începutul studiului, diferența de greutate între animale nu trebuie să depășească cu mai mult de ± 20 % valoarea medie. Atunci când studiul de toxicitate subcronică prin administrare orală este efectuat ca fază preliminară a unui studiu pe termen lung, trebuie să se folosească aceeași specie și linie pentru ambele studii.

Număr și sex

În cazul rozătoarelor se folosesc cel puțin 100 de animale (50 femele și 50 masculi) pentru fiecare doză și pentru lotul martor. Femelele trebuie să fie nulipare și negestante. Dacă se prevede sacrificarea unui număr de animale pe parcursul studiului, efectivul trebuie mărit cu numărul de animale preconizate a fi sacrificate până la sfârșitul studiului.

Doze și frecvența expunerii

În afara loturilor martor corespunzătoare, se mai folosesc cel puțin trei doze și un lot martor. Doza maximă ar trebui să fie suficient de mare încât să provoace semne de toxicitate minimă, de exemplu o ușoară diminuare a ritmului de creștere în greutate (mai puțin de 10 %), fără a schimba semnificativ speranța de viață normală datorită altor efecte decât tumorile.

Doza minimă nu trebuie să interfereze cu creșterea normală, dezvoltarea și longevitatea animalului sau să prezinte vreun indiciu de toxicitate. În general, această doză nu trebuie să fie mai mică de 10 % din doza maximă.

Doza sau dozele intermediare se stabilesc în intervalul mediu dintre doza maximă și cea minimă.

Alegerea nivelurilor dozei ia în considerare datele din testele și studiile de toxicitate precedente.

Frecvența expunerii este, în mod normal, zilnică. Dacă substanța se administrează în apa de băut sau se amestecă în hrană, acestea trebuie să fie permanent disponibile.

Loturi martor

Se folosește un lot martor care este în toate privințele identic cu loturile tratate, cu excepția expunerii la substanța de testat.

În situații speciale, cum ar fi studiile de toxicitate prin inhalare de aerosoli sau studiile de toxicitate prin administrare orală care folosesc un emulsifiant cu activitate biologică neanalizată, se poate folosi un lot martor suplimentar, care nu este expus nici la vehicul.

Calea de administrare

Cele trei căi de administrare principale sunt orală, cutanată și prin inhalare. Alegerea căii de administrare depinde de caracteristicile fizice și chimice ale substanței de testat și de calea de expunere probabilă în cazul omului.

Studii de toxicitate prin administrare orală

Atunci când substanța de testat este absorbită din tractul gastro-intestinal, iar ingestia poate fi una din căile la care poate fi expus și omul, se preferă calea orală de administrare, dacă nu există contraindicații. Animalele pot primi substanța de testat în hrană, dizolvată în apa de băut sau sub formă de capsule.

În mod ideal, se folosesc doze zilnice timp de șapte zile pe săptămână, pentru că dozarea pentru cinci zile poate permite remiterea sau diminuarea toxicității în perioadele fără tratament, afectând astfel rezultatele și evaluarea lor. Cu toate acestea, în primul rând din considerente practice, administrarea timp de cinci zile pe săptămână este acceptată.

Studii de toxicitate prin administrare cutanată

Expunerea cutanată prin badijonarea pielii poate fi folosită pentru a simula o cale principală de expunere umană și ca modalitate de inducere a leziunilor cutanate.

Studii de toxicitate prin inhalare

Deoarece studiile de toxicitate prin inhalare ridică probleme tehnice de o mai mare complexitate în comparație cu celelalte căi de administrare, în cele ce urmează se prezintă îndrumări detaliate privind acest mod de administrare. Trebuie remarcat că în anumite situații o alternativă viabilă o constituie instilațiile intratraheale.

Expunerile pe termen lung se modelează de obicei după posibila expunere a omului: substanța se administrează fie zilnic, timp de 6 ore, după echilibrarea concentrației în incintă, câte cinci zile pe săptămână (expunere intermitentă), fie, dacă se urmăresc efectele unei posibile expuneri în mediul înconjurător, timp de 22 – 24 ore/zi, câte șapte zile pe săptămână (expunere continuă), în acest ultim caz cu pauză de o oră/zi pentru hrănirea animalelor, în același moment al zilei și menținând condițiile specifice din incintă. În ambele cazuri, animalele sunt expuse de obicei la concentrații constante de substanță de testat.

Diferența esențială dintre expunerea intermitentă și cea continuă este aceea că în primul caz există o perioadă de 17 – 18 ore în care animalele se pot reface după efectele fiecărei expuneri zilnice, refacere chiar mai îndelungată la sfârșit de săptămână.

Alegerea modalității de expunere - intermitentă sau continuă - depinde de obiectivele studiului și de tipul de expunere umană simulat. Cu toate acestea, trebuie avute în vedere anumite dificultăți tehnice. De exemplu, avantajul expunerii continue prin simularea condițiilor de mediu este contrabalansat de cerința hrănirii și adăpării animalelor în timpul expunerii și de necesitatea de a dispune de tehnici mai complicate (și mai fiabile) atât de generare a aerosolilor și a vaporilor, cât și de monitorizare.

Incinte de testare

Animalele se expun la substanța de testat în incinte de inhalare concepute pentru a asigura un flux continuu sau cel puțin 12 aerisiri pe oră, garantând un conținut de oxigen adecvat și o distribuție uniformă a produsului de testat în aer. Incinta martor și cea de testare trebuie să fie identice ca proiectare și construcție, astfel încât să asigure condiții comparabile sub toate aspectele, cu excepția expunerii la substanțele de testat. În incintă se menține o presiune ușor negativă pentru a împiedica pierderea substanței de testat în zona înconjurătoare. În incinte trebuie redusă la minim aglomerarea animalelor testate. De regulă, pentru a asigura stabilitatea atmosferei din incintă, volumul total al animalelor nu trebuie să depășească 5 % din volumul incintei.

Se măsoară și se controlează:

(i) fluxul de aer: debitul de aer în incintă este recomandabil să fie monitorizat continuu;

(ii) concentrația: pe parcursul expunerii zilnice, concentrația substanței de testat nu trebuie să varieze cu mai mult de ± 15 % din valoarea medie. Pe întreaga durată a studiului, concentrațiile zilnice trebuie să fie menținute, pe cât posibil, la niveluri constant;

(iii) temperatura și umiditatea: în cazul rozătoarelor, temperatura trebuie menținută la 22 ± 2 °C, iar umiditatea din incintă la 30 – 70 %, exceptând cazurile în care se folosește apă ca mediu de suspensie pentru substanță de testat în atmosfera incintei (aerosoli). De preferință, ambii parametri trebuie să fie monitorizați continuu;

(iv) analiza granulometrică a particulelor: în atmosfera incintei unde există aerosoli lichizi sau solizi, trebuie să fie determinată distribuția granulometrică a particulelor. Particulele din componența aerosolilor trebuie să aibă o dimensiune compatibilă cu respirarea lor de către animalele testate. Probele din atmosfera incintei se prelevează de la nivelul zonei de respirație. Probele de aer trebuie să fie reprezentative din punct de vedere al distribuției particulelor la care sunt expuse animalele și trebuie să reflecte, în termeni gravimetrici, toate suspensiile de tip aerosol, chiar dacă o mare parte din acestea nu sunt respirabile. În perioada întregului studiu este necesară menținerea concentrațiilor administrate zilnic la valori constante, pe cât este posibil. Pe durata generării aerosolilor trebuie efectuată analiza granulometrică pentru a determina stabilitatea concentrației acestora și după aceea, cât de des este necesar în timpul expunerii pentru a determina în mod corespunzător măsura în care este constantă distribuția particulelor la care au fost expuse animalele.

Durata studiului

Durata studiului de cancerogeneză acoperă o perioadă mare de timp în raport cu viața animalelor de experiență. În cazul șoarecilor și hamsterilor, testul se încheie la 18 luni de la momentul inițial, iar în cazul șobolanilor, la 24 de luni; cu toate acestea, în cazul unor linii cu longevitate mai mare și/sau cu o rată mai scăzută de apariție a tumorilor, testul se va încheia după 24 de luni în cazul șoarecilor și hamsterilor, respectiv după 30 de luni în cazul șobolanilor. Alternativ, încheierea unui asemenea test prelungit este acceptabilă atunci când numărul supraviețuitorilor în lotul martor tratat cu doza minimă atinge 25 %. Dacă după încheierea testului se înregistrează răspunsuri diferite în funcție de sex, animalele de același sex trebuie tratate separat. În cazul în care numai animalele din lotul tratat cu doza maximă mor prematur din motive evident legate de toxicitate, acest lucru nu impune încheierea testului decât dacă manifestările toxice cauzează apariția problemelor la alte loturi. Pentru ca rezultatul negativ al unui test să fie acceptabil, se impune ca maxim 10 % din animalele din fiecare lot să fie eliminate timpul experimentului prin autoliză, canibalism sau probleme organizatorice, iar rata supraviețuitorilor din toate loturile să fie mai mare de 50 % la 18 luni de la începerea studiului pentru șoareci și hamsteri și la 24 de luni în cazul șobolanilor.

Mod de operare

Observații

Trebuie efectuate observații zilnice care să cuprindă eventuale modificări ale pielii, blănii, ochilor și mucoaselor, precum și ale sistemelor respirator și circulator, sistemului nervos central și autonom, ale activității somato-motrice și ale comportamentului.

Animalele sunt observate cu regularitate, pentru a evita pe cât posibil pierderea lor din motive exterioare experimentului, cum ar fi: canibalism, autoliză a țesuturilor sau greșeală de plasare a exemplarelor. Animalele muribunde sunt retrase imediat și supuse autopsiei.

Pentru toate animalele se înregistrează semnele clinice și mortalitatea. O atenție specială trebuie acordată dezvoltării tumorilor: se înregistrează momentul apariției, localizarea, dimensiunile, aspectul și dezvoltarea atât a tumorilor vizibile macroscopic, cât și a celor palpabile.

Consumul de hrană și de apă (în cazul în care substanța de testat se administrează în apa de băut) se măsoară săptămânal în primele 13 săptămâni de studiu, apoi la intervale de aproximativ trei luni, exceptând cazurile în care starea de sănătate și greutatea corporală a animalelor impun alte intervale.

Greutatea corporală trebuie înregistrată o dată pe săptămână pentru fiecare animal în timpul primelor 13 săptămâni de testare, apoi cel puțin o dată la patru săptămâni.

Examene clinice

Examen hematologic

Dacă observațiile zilnice sugerează o deteriorare a stării de sănătate a animalelor pe parcursul studiului, se stabilește formula leucocitară a fiecărui animal afectat.

La 12 luni, la 18 luni și înainte de sacrificare, se recoltează probe de sânge. Se determină formula leucocitară pe probe prelevate de la animalele aparținând lotului expus la doza maximă și lotului martor. Dacă datele, în special cele obținute înainte de sacrificare, sau rezultatele examinării patologice sugerează că este necesar, se determină formula leucocitară și pentru lotul sau loturile cu doza imediat inferioară.

Autopsia

Se efectuează autopsia generală a tuturor animalelor, inclusiv a celor care mor pe parcursul experimentului sau care au fost sacrificate, fiind muribunde. Se conservă toate leziunile macroscopice, tumorile sau leziunile suspecte de a deveni tumori.

Toate organele și țesuturile trebuie conservate într-un mediu corespunzător în vederea unui viitor examen histopatologic: creierul (inclusiv porțiuni din bulbul rahidian, punte, cortexul cerebelos și cortexul cerebral), glanda pituitară, tiroida/paratiroida, timusul, plămânii și traheea, inima, aorta, glandele salivare, ficatul, splina, rinichii, glandele suprarenale, esofagul, stomacul, duodenul, jejunul, ileonul, cecul, colonul, rectul, uterul, vezica urinară, ganglionii limfatici, pancreasul, gonadele, organele genitale anexe, glandele mamare feminine, pielea, mușchii, nervii periferici, sternul cu măduvă, femurul (inclusiv articulația), măduva spinării la trei niveluri (cervical, toracic și lombar) și ochii.

Umplerea plămânilor și a vezicii urinare cu fixator prezintă modalitatea optimă de conservare a acestora; în studiile de toxicitate prin inhalare, umplerea plămânilor este o cerință esențială pentru examinarea histopatologică adecvată. În cazul acestor studii, întregul tract respirator trebuie conservat, inclusiv cavitatea nazală, faringele și laringele.

Examen histopatologic

(a) se efectuează examenul histopatologic complet al organelor și țesuturilor pentru toate animalele care mor sau sunt sacrificate în perioada testului, precum și pentru toate animalele din loturile martor și loturile tratate expuse la doza maximă;

(b) se examinează microscopic toate tumorile vizibile sau leziunile suspecte a deveni tumori, pentru fiecare lot, indiferent de organul afectat;

(c) dacă există o diferență semnificativă între incidența apariției leziunilor neoplazice între loturile martor și lotul expus la doza maximă, atunci se impune examinarea histopatologică a organului sau țesutului respectiv în cazul celorlalte loturi;

(d) dacă supraviețuirea în lotul expus la doza maximă este substanțial mai mică decât în lotul martor, atunci se impune examinarea completă a loturilor expuse la doza imediat inferioară;

(e) dacă în lotul expus la doza maximă este dovedită prezența unor efecte toxice sau de alt tip care ar putea afecta răspunsul neoplazic, atunci se impune examinarea completă la loturile expuse la doza imediat inferioară.

2. **REZULTATE**

Datele se sistematizează într-un tabel care indică, pentru fiecare lot de experiență, numărul de animale la începutul testului, numărul de animale care prezintă tumori sau efecte toxice detectate în perioada testului, momentul apariției acestora, precum și numărul animalelor la care s-au constatat tumori după sacrificare. Toate rezultatele observate se evaluează cu ajutorul unei metode statistice adecvate. Se poate folosi orice metodă statistică recunoscută.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— specia, linia, originea, condițiile ambiante, regimul alimentar;

— condițiile experimentale:

Descrierea aparatului de expunere:

inclusiv concepția, tipul, dimensiunile, sursa de aer, sistemul generator de particule și de aerosoli, metoda de condiționare a aerului, tratarea aerului expirat și, după caz, modul de adăpostire a animalelor în incinta de testare, atunci când se folosește o astfel de incintă. Se descrie echipamentul folosit pentru măsurarea temperaturii și, dacă este necesar, stabilitatea concentrației de aerosoli sau granulometria particulelor.

Datele privind expunerea:

se prezintă sub forma unui tabel care indică valorile medii, precum și măsura variabilității (de exemplu, deviația standard) și trebuie să includă:

(a) debitul de aer în dispozitivul de inhalare;

(b) temperatura și umiditatea aerului;

(c) concentrațiile nominale (cantitatea totală de substanță de testat introdusă în dispozitivul de inhalare raportată la volumul de aer);

(d) după caz, natura vehiculului;

(e) concentrațiile reale din zona de respirație;

(f) dimensiunile mediane ale particulelor (după caz);

— dozele (inclusiv vehiculul, dacă este cazul) și concentrațiile;

— incidența tumorilor pe sexe, doză și tip de tumoare;

— momentul morții în timpul experimentului sau indicarea faptului că animalele au supraviețuit experimentului;

— răspunsul toxic pe sexe și doză;

— efectele toxice sau de alt tip;

— momentul observării oricărui simptom anormal și evoluția acestuia;

— consumul de hrană și greutatea corporală;

— examenele hematologice întreprinse și rezultatele complete;

— rezultatele autopsiei;

— descrierea detaliată a tuturor observațiilor histopatologice;

— tratarea statistică a rezultatelor, după caz;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare și interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

STUDIU COMBINAT DE TOXICITATE CRONICĂ ȘI DE CANCEROGENEZĂ

1. METODĂ

1.1. Introducere

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. Definiții

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. Substanțe de referință

Nici una.

1.4. Principiul metodei de testare

Obiectivul studiului combinat de toxicitate cronică/cancerogeneză este acela de a determina efectele cronice și cancerigene ale unei substanțe după administrare prelungită la o specie de mamifere.

În acest scop, studiul de cancerogeneză se suplimentează cu cel puțin un lot satelit tratat și un lot satelit martor. Doza folosită pentru lotul satelit expus la doza maximă poate fi mai mare decât cea utilizată pe loturile expuse la doza maximă în studiile de cancerogeneză. Animalele folosite la acest test sunt examinate atât cu privire la toxicitatea generală cât și la răspunsul cancerigen. Animalele din lotul satelit tratat sunt examinate din punct de vedere al toxicității generale.

Substanța de testat se administrează în mod normal șapte zile pe săptămână, pe o cale de administrare convenabilă, la mai multe loturi de animale, o doză pentru fiecare lot, pe o perioadă îndelungată în raport cu viața lor. În timpul și după expunerea la substanța de testat, animalele sunt observate zilnic în vederea detectării semnelor de toxicitate și a dezvoltării tumorilor.

1.5. Criterii de calitate

Nici unul.

1.6. Descrierea metodei de testare

Se țin animalele în condițiile de adăpostire și de alimentare specifice experimentului cel puțin în cele 5 zile care îl preced. Înainte de începerea testului, animalele tinere sănătoase se repartizează aleatoriu în loturi tratate și loturi martor.

Animale de experiență

Specia preferată este șobolanul. Pe baza rezultatelor din teste anterioare pot fi folosite și alte specii de animale (rozătoare sau nerozătoare). Se folosesc animale tinere, sănătoase, aparținând unei linii de laborator obișnuite și administrarea dozei începe cât mai curând după înțărcare.

La începutul experimentului, diferența de greutate între animale nu trebuie să depășească cu mai mult de ± 20 % valoarea medie. Atunci când studiul de toxicitate subcronică prin administrare orală este efectuat ca fază preliminară a unui studiu pe termen lung, trebuie să se folosească aceeași specie și linie pentru ambele studii.

Număr și sex

În cazul rozătoarelor se folosesc cel puțin 100 de animale (50 femele și 50 masculi) pentru fiecare doză și pentru lotul martor. Femelele trebuie să fie nulipare și negestante. Dacă se prevede sacrificarea unui număr de animale pe parcursul studiului, acest număr se adaugă la total.

Lotul sau loturile satelit tratate în scopul evaluării altor efecte patologice decât tumorile trebuie să cuprindă câte 20 de animale de fiecare sex, în timp ce lotul satelit martor trebuie să cuprindă 10 animale/sex.

Doze și frecvența expunerii

Pentru studiile de cancerogeneză, se folosesc cel puțin trei doze și un lot martor. Doza maximă ar trebui să provoace semne de toxicitate minimă, de exemplu o ușoară diminuare a ritmului de creștere în greutate (mai puțin de 10 %), fără să schimbe semnificativ speranța de viață normală datorită altor efecte decât tumorile.

Doza minimă nu trebuie să interfereze cu creșterea normală, dezvoltarea și longevitatea animalului sau să prezinte vreun indiciu de toxicitate. În general, această doză nu trebuie să fie mai mică de 10 % din doza maximă.

Doza sau dozele intermediare se fixează pe segmentul mediu al intervalului dintre doza maximă și cea minimă.

Alegerea nivelurilor dozei ia în considerare datele din precedentele teste și studii de toxicitate.

Pentru studierea toxicității cronice, se includ în studiu alte loturi tratate, precum și un lot satelit martor corespunzător. Pentru animalele din lotul satelit tratat doza puternică este aleasă astfel încât să producă un efect toxic sigur.

Frecvența expunerii este, în mod normal, zilnică. Dacă substanța chimică se administrează în apa de băut sau se amestecă în hrană, acestea trebuie să fie permanent disponibile.

Loturi martor

Se folosește simultan un lot martor care este în toate privințele identic cu loturile tratate, cu excepția expunerii la substanța tratată.

În situații speciale, cum ar fi studiile de toxicitate prin inhalare de aerosoli sau studiile de toxicitate prin administrare orală care folosesc un emulsifiant cu activitate biologică neanalizată, se poate folosi un lot martor suplimentar care nu este expus nici la vehicul.

Cale de administrare

Cele trei căi de administrare principale sunt orală, cutanată și prin inhalare. Alegerea căii de administrare depinde de caracteristicile fizice și chimice ale substanței de testat și de calea de expunere probabilă în cazul omului.

Studii de toxicitate prin administrare orală

Atunci când substanța de testat este absorbită din tractul gastro-intestinal, iar ingestia poate fi una din căile la care poate fi expus și omul, se preferă calea orală de administrare, dacă nu există contraindicații. Animalele pot primi substanța de testat în hrană, dizolvată în apa de băut sau sub formă de capsule. În mod ideal, se folosesc doze zilnice timp de șapte zile pe săptămână, pentru că dozarea pentru cinci zile poate permite refacerea animalului sau diminuarea toxicității în perioadele fără tratament, afectând astfel rezultatele și evaluarea lor. Cu toate acestea, în primul rând din considerente practice, administrarea timp de cinci zile pe săptămână este acceptată.

Studii de toxicitate prin administrare cutanată

Expunerea cutanată prin badijonarea pielii poate fi folosită pentru a simula o cale principală de expunere umană și ca modalitate de inducere a leziunilor cutanate.

Studii de toxicitate prin inhalare

Deoarece studiile de toxicitate prin inhalare ridică probleme tehnice de o mai mare complexitate în comparație cu celelalte căi de administrare, în cele ce urmează se prezintă recomandări detaliate privind acest mod de administrare. Trebuie remarcat că în anumite situații o alternativă viabilă o constituie instilațiile intratraheale.

Expunerile pe termen lung se modelează, de obicei, după posibila expunere a omului: substanța se administrează fie zilnic, timp de 6 ore, după echilibrarea concentrației în incintă, câte cinci zile pe săptămână (expunere intermitentă), fie, dacă se urmăresc efectele unei posibile expuneri în mediul înconjurător, timp de 22 – 24 ore/zi, câte șapte zile pe săptămână (expunere continuă), în acest ultim caz cu pauză de o oră/zi pentru hrănirea animalelor în același moment al zilei și menținând condițiile specifice din incintă. În ambele cazuri, animalele sunt expuse de obicei la concentrații constante de substanță. Diferența esențială dintre expunerea intermitentă și cea continuă este aceea că în primul caz există o perioadă de 17 – 18 ore în care animalele se pot reface după efectele fiecărei expuneri zilnice, refacere chiar mai îndelungată la sfârșit de săptămână.

Alegerea modalității de expunere - intermitentă sau continuă - depinde de obiectivele studiului și de tipul de expunere umană simulat. Cu toate acestea, trebuie avute în vedere anumite dificultăți tehnice. De exemplu, avantajele expunerii continue prin simularea condițiilor de mediu sunt contrabalansate de necesitatea hrănirii și adăpării animalelor în timpul expunerii și de necesitatea de a dispune de tehnici mai complicate (și mai fiabile) atât de generare a aerosolilor și a vaporilor, cât și de monitorizare.

Incinte de testare

Animalele se expun la substanța de testat în incinte de inhalare concepute pentru a asigura un flux continuu de cel puțin 12 aerisiri pe oră, garantând un conținut de oxigen adecvat și o distribuție uniformă a substanței de testat în aer. Incinta martor și cea de testare trebuie să fie identice ca proiectare și construcție, astfel încât să asigure condiții comparabile sub toate aspectele, cu excepția expunerii la substanțele de testat. În incintă se menține o presiune ușor negativă pentru a împiedica pierderea substanței de testat în zona înconjurătoare. În incinte trebuie redusă la minim aglomerarea animalelor testate. De regulă, pentru a asigura stabilitatea atmosferei din incintă, volumul total al animalelor nu trebuie să depășească 5 % din volumul incintei.

Se măsoară și se controlează:

(i) fluxul de aer: debitul de aer în incintă este recomandabil să fie monitorizat continuu;

(ii) concentrația: pe parcursul expunerii zilnice, concentrația substanței de testat nu trebuie să varieze cu mai mult de ± 15 % din valoarea medie. Pe întreaga durată a studiului, concentrațiile zilnice trebuie să fie menținute, pe cât posibil, la niveluri constante;

(iii) temperatura și umiditatea: în cazul rozătoarelor, temperatura trebuie menținută la 22 ± 2 °C iar umiditatea din incintă la 30 – 70 %, exceptând cazurile în care se folosește apă ca mediu de suspensie pentru substanță de testat în atmosfera incintei. De preferință, ambii parametri trebuie să fie monitorizați continuu;

(iv) analiza granulometrică a particulelor: trebuie să fie determinată distribuția granulometrică a particulelor în atmosfere ale incintei în care se folosesc aerosoli lichizi sau solizi. Particulele din componența aerosolilor trebuie să aibă o dimensiune compatibilă cu respirarea lor de către animalele testate. Probele din atmosfera incintei se prelevează de la nivelul zonei de respirație. Probele de aer trebuie să fie reprezentative din punct de vedere al distribuției particulelor la care sunt expuse animalele și trebuie să reflecte, în termeni gravimetrici, toate suspensiile de tip aerosol, chiar dacă o mare parte din acestea nu sunt respirabile. Pe durata întregului studiu este necesară menținerea concentrațiilor administrate zilnic la valori constante, pe cât este posibil. Pe durata generării aerosolilor trebuie efectuată frecvent analiza granulometrică pentru a determina stabilitatea concentrației acestora și ulterior cât de des este necesar în timpul expunerii, pentru a determina în mod corespunzător măsura în care este constantă distribuția particulelor la care au fost expuse animalele.

Durata testului

Durata segmentului de test cu privire la cancerogeneză acoperă o perioadă mare de timp în raport cu viața animalelor de experiență. În cazul șoarecilor și hamsterilor, testul se încheie la 18 luni de la momentul inițial, iar în cazul șobolanilor – la 24 de luni; cu toate acestea, în cazul unor linii cu longevitate mai mare și/sau cu o rată mai scăzută de apariție a tumorilor, testul se va încheia după 24 de luni în cazul șoarecilor și hamsterilor, respectiv după 30 de luni în cazul șobolanilor. Alternativ, încheierea unui asemenea test prelungit este acceptabilă atunci când numărul supraviețuitorilor în lotul martor tratat cu doza minimă atinge 25 %. Dacă după încheierea testului se înregistrează răspunsuri diferite în funcție de sex, animalele de același sex trebuie tratate separat. În cazul în care numai animalele din lotul tratat cu doza maximă mor prematur din motive evident legate de toxicitate, acest lucru nu impune încheierea testului decât dacă manifestările toxice cauzează apariția problemelor la alte loturi. Pentru ca rezultatul negativ al unui test să fie acceptabil, se impune ca procentul animalelor din fiecare lot care se elimină în timpul experimentului prin autoliză, canibalism sau probleme organizatorice să nu depășească 10 %, iar rata supraviețuitorilor din toate loturile să nu fie sub 50 % la 18 luni de la începerea studiului pe șoareci și hamsteri și la 24 de luni în cazul șobolanilor.

Loturile satelit alcătuite din 20 animale/sex și loturile martor satelit corespunzătoare, alcătuite din 10 animale/sex și folosite la testarea toxicității cronice, trebuie menținute în experiment timp de cel puțin 12 luni. Aceste animale urmează să fie sacrificate pentru a examina patologia indusă de substanța de testat, dar necomplicată cu modificări gerontologice.

Mod de operare

Observații

Trebuie efectuate observații zilnice în cușcă care să cuprindă eventuale modificări ale pielii, blănii, ochilor și mucoaselor, precum și ale sistemului respirator, ale sistemului circulator, ale sistemului nervos central și autonom, ale activității somato-motrice și ale comportamentului.

La intervale adecvate se procedează la examinarea clinică a animalelor din lotul sau loturile satelit tratate.

Animalele sunt observate cu regularitate, pentru a evita pe cât posibil pierderea lor din motive cum ar fi canibalismul, autoliza țesuturilor sau plasarea greșită a exemplarelor. Animalele muribunde sunt retrase imediat și sunt supuse autopsiei.

Pentru toate animalele se înregistrează semnele clinice, în special modificările neurologice și oculare, și mortalitatea. O atenție specială trebuie acordată dezvoltării tumorilor: se înregistrează momentul apariției, localizarea, dimensiunile, aspectul și dezvoltarea atât a tumorilor vizibile macroscopic, cât și a celor palpabile; se înregistrează momentul apariției și evoluția stărilor toxice.

Consumul de hrană și de apă (în cazul în care substanța de testat se administrează în apa de băut) se măsoară săptămânal în primele 13 săptămâni de studiu, apoi la intervale de aproximativ trei luni, exceptând cazurile în care starea de sănătate și greutatea corporală a animalelor impun alte intervale.

Greutatea corporală trebuie înregistrată o dată pe săptămână pentru fiecare animal în timpul primelor 13 săptămâni de testare, apoi cel puțin o dată la patru săptămâni.

Examene clinice

Examen hematologic

Examenul hematologic (de exemplu: hemoglobina, hematocritul, concentrația hemoglobinei, număr de hematii, număr de leucocite sau alte măsurători ale potențialului de coagulare) trebuie realizat la trei și la șase luni și apoi la un interval de șase luni; la sfârșitul studiului se recoltează probe de sânge de la 10 șobolani/sex din toate loturile. Dacă este posibil, probele se prelevează de fiecare dată de la aceiași șobolani.

Dacă observațiile zilnice efectuate în perioada în care sunt ținute în cușcă sugerează o deteriorare a stării de sănătate a animalelor pe parcursul studiului, se stabilește formula leucocitară a fiecărui animal afectat.

Se examinează formula leucocitară pe probe prelevate de la animalele din lotul expus la doza maximă și din loturile martor. La lotul sau loturile de animale expuse la dozele imediat inferioare, aceste determinări se vor efectua numai dacă se constată diferențe majore între lotul martor și lotul expus la doza maximă sau dacă există alte indicii patologice.

Analiza urinei

Trebuie colectate probe de urină de la 10 șobolani/sex din toate loturile, dacă este posibil de la aceiași șobolani, la același interval de timp, ca și în cazul examenului hematologic. Pentru fiecare animal sau pe o probă comună/sex/lot de rozătoare, se fac următoarele determinări:

— aspect: volum și densitate pentru fiecare animal;

— proteine, glucoză, corpi cetonici, hemoragii oculte (semicantitativ);

— microscopia sedimentului urinar (semicantitativ).

Biochimie clinică

La intervale de aproximativ 6 luni, precum și la sfârșitul experimentului se recoltează probe de sânge pentru determinări biochimice de la toate animalele nerozătoare și de la câte 10 șobolani/sex din toate loturile, dacă este posibil de fiecare dată de la aceiași șobolani. În plus, de la nerozătoare trebuie să se recolteze probe înaintea testului. Pe plasma obținută din aceste probe se vor efectua următoarele determinări:

— concentrația proteinelor totale;

— concentrația albuminelor;

— teste ale funcției hepatice: activitatea fosfatazei alcaline, transaminază glutampiruvică ([1]) transaminază oxalacetică ([2]), gamma glutamil transpeptidază, ornitin decarboxilază;

— metabolismul carbohidraților, cum ar fi glucoza à jeun;

— teste ale funcției renale, cum ar fi azotul ureic din sânge.

([1]) În prezent cunoscută sub denumirea de alanin aminotransferază.
([2]) În prezent cunoscută sub denumirea de aspartat aminotransferază.

Autopsia

Se efectuează autopsia generală a tuturor animalelor, inclusiv a celor care mor pe parcursul experimentului sau care au fost sacrificate, fiind muribunde. Înainte de sacrificare, se prelevează probe de sânge de la toate animalele, pentru stabilirea formulei leucocitare. Se conservă toate leziunile macroscopice, tumorile sau leziunile suspecte de a deveni tumori. Se procedează la corelarea observațiilor macroscopice cu rezultatele microscopice.

Toate organele și țesuturile trebuie conservate într-un mediu corespunzător în vederea examenului histopatologic: creier ([1]) (bulb rahidian, punte, cortex cerebelos și cortex cerebral), glanda pituitară, tiroida (inclusiv paratiroida), timus, plămâni (inclusiv trahee), inimă, aortă, glandele salivare, ficat ([1]), splină, rinichi ([1]), glande suprarenale ([1]), esofag, stomac, duoden, jejun, ileon, cec, colon, rect, uter, vezica urinară, ganglioni limfatici, pancreas, gonade ([1]), organele genitale anexe, glandele mamare feminine, piele, musculatură, nervi periferici, măduva spinării (cervicală, toracică, lombară) stern cu măduvă și femur (inclusiv articulația) și ochi.

Deși umplerea plămânilor și a vezicii urinare cu fixator reprezintă modalitatea optimă de conservare a acestora, în studiile de toxicitate prin inhalare, umplerea plămânilor este o cerință esențială pentru examinarea histopatologică adecvată. În cazul acestor studii, întregul tract respirator trebuie conservat, inclusiv cavitatea nazală, faringele și laringele.

Dacă se realizează și alte examinări clinice, informațiile obținute din aceste studii trebuie să fie disponibile înainte de examinarea microscopică, deoarece pot să dea indicii medicului patolog.

Examen histopatologic

Pentru segmentul studiului care urmărește toxicitatea cronică:

Se examinează în detaliu toate organele conservate ce provin de la toate animalele din lotul satelit tratat cu doza maximă și din lotul sau loturile martor. Dacă la lotul satelit tratat cu doza maximă se stabilește o patologie în legătură cu substanța de testat, organele țintă ale tuturor animalelor din orice alt lot satelit tratat vor fi examinate complet și detaliat din punct de vedere histologic, precum și animalele din loturile tratate din segmentul studiului privind cancerogeneza, la sfârșitul acestuia.

Pentru segmentul studiului care urmărește cancerogeneza:

(a) se efectuează examenul histopatologic complet al organelor și țesuturilor pentru toate animalele care mor sau sunt sacrificate în perioada testului, precum și pentru toate animalele din lotul martor și loturile expuse la doza maximă;

(b) se examinează microscopic toate tumorile vizibile sau leziunile suspecte a deveni tumori, pentru fiecare lot, indiferent de organul afectat;

(c) dacă există o diferență semnificativă între incidența apariției leziunilor neoplazice între loturile martor și lotul expus la doza maximă, atunci se impune examinarea histopatologică a organului sau țesutului respectiv în cazul celorlalte loturi;

(d) dacă supraviețuirea în lotul expus la doza maximă este substanțial mai mică decât în lotul martor, atunci se impune examinarea completă a loturilor expuse la doza imediat inferioară;

(e) dacă în lotul expus la doza maximă este dovedită prezența unor efecte toxice sau de alt tip care ar putea afecta răspunsul neoplazic, atunci se impune examinarea completă la loturile expuse la doza imediat inferioară.

2. **REZULTATE**

Datele se sistematizează într-un tabel care indică, pentru fiecare lot de experiență, numărul de animale la începutul testului, numărul de animale care prezintă tumori sau efecte toxice detectate în perioada testului, momentul apariției acestora, precum și numărul animalelor care au prezentat tumori la autopsie. Toate rezultatele observate se evaluează cu ajutorul unei metode statistice adecvate. Se poate folosi orice metodă statistică recunoscută.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— specia, linia, originea, condițiile ambiante, regimul alimentar etc.;

([1]) Aceste organe se recoltează de la 10 animale/sex/lot în cazul rozătoarelor și de la toate nerozătoarele și se cântăresc.

— condițiile experimentale:

Descrierea aparatului de expunere:

inclusiv concepția, tipul, dimensiunile, sursa de aer, sistemul generator de particule și de aerosoli, metoda de condiționare a aerului, tratarea aerului expirat și, după caz, modul de adăpostire a animalelor în incinta de testare. Se descrie echipamentul folosit pentru măsurarea temperaturii, umidității și, dacă este necesar, stabilitatea concentrației de aerosoli și granulometria particulelor.

Datele privind expunerea:

se prezintă sub forma unui tabel care indică valorile medii, precum și măsura variabilității (de exemplu, deviația standard) și trebuie să includă:

(a) debitul de aer în dispozitivul de inhalare;

(b) temperatura și umiditatea aerului;

(c) concentrațiile nominale (cantitatea totală de substanță de testat introdusă în dispozitivul de inhalare divizată la volumul de aer);

(d) după caz, natura vehiculului;

(e) concentrațiile reale din zona de respirație;

(f) dimensiunile mediane ale particulelor (după caz);

— dozele (inclusiv vehiculul, dacă este cazul) și concentrațiile;

— incidența tumorilor pe sexe, doză și tip de tumoare;

— momentul morții în timpul studiului sau indicarea faptului că animalele au supraviețuit studiului;

— răspunsul toxic pe sexe și doză;

— descrierea efectelor toxice sau de alt tip;

— momentul observării fiecărui simptom anormal și evoluția acestuia;

— observații oftalmologice;

— consumul de hrană și greutatea corporală;

— examenele hematologice întreprinse și rezultatele complete;

— testul biochimic clinic practicat și rezultatele complete (inclusiv cele urinare);

— rezultatele autopsiei;

— descrierea detaliată a tuturor observațiilor histopatologice;

— tratarea statistică a rezultatelor, după caz;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare și interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

STUDIU DE TOXICITATE PRIVIND REPRODUCEREA LA O GENERAȚIE

1. METODĂ

1.1. Introducere

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. Definiții

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. Substanțe de referință

Nici una.

1.4. Principiul metodei de testare

Substanța de testat se administrează în doze crescătoare mai multor loturi de masculi și femele. Masculii trebuie tratați în timpul perioadei de creștere și pe durata a cel puțin unui ciclu spermatogen complet (aproximativ 56 de zile la șoarece și 70 de zile la șobolan), astfel încât substanța de testat să își producă efectele adverse asupra spermatogenezei.

Femelele din generația parentală (P) trebuie să fie tratate pe perioada a cel puțin două cicluri estrale complete astfel încât substanța de testat să producă efectele adverse asupra ciclului estral. Apoi animalele sunt împerecheate. Substanța de testat se administrează ambelor sexe în perioada împerecherii, iar apoi numai femelelor în perioada gestației și a alăptării.

În cazul administrării prin inhalare, metoda va fi adaptată.

1.5. Criterii de calitate

Nici unul.

1.6. Descrierea metodei de testare

Pregătire

Înainte de testare, animalele tinere sănătoase se repartizează aleatoriu în loturi tratate și loturi martor. Se țin animalele în condițiile de adăpostire și de alimentare specifice experimentului cel puțin în cele 5 zile care îl preced.

Se recomandă ca substanța de testat să se administreze în hrană sau în apa de băut. Și alte căi de administrare sunt acceptabile. Aceeași metodă de administrare va fi utilizată pentru toate animalele pe tot parcursul experimentului. Dacă se folosește un vehicul sau alți aditivi pentru a facilita administrarea, aceștia trebuie să nu aibă efecte toxice.

Tratamentul se face zilnic, șapte zile pe săptămână.

Animale de experiență

Alegerea speciei

Specia preferată este șoarecele sau șobolanul. Se folosesc animale sănătoase, care nu au mai fost supuse anterior altor experimente. Nu se recomandă folosirea liniilor cu fertilitate scăzută. Animalele de experiență trebuie caracterizate în termeni de specie, linie de descendență, sex, greutate și/sau vârstă.

Pentru o evaluare corespunzătoare a fertilității se studiază atât femelele, cât și masculii. Toate animalele tratate și cele martor trebuie înțărcate înainte de a începe tratamentul.

Număr și sex

Fiecare lot martor și fiecare lot tratat trebuie să conțină suficiente animale pentru a se asigura un număr de 20 de femele gestante în momentul sau aproape de momentul fătării.

Obiectivul este acela de a avea un număr suficient de femele gestante și descendenți pentru a asigura o evaluare reprezentativă a potențialului substanței de testat de a afecta fertilitatea, gestația și comportamentul matern la animalele din generația P, precum și suptul, creșterea și dezvoltarea la descendenții F_1, de la concepție până la înțărcare.

Condiții experimentale

Hrana și apa trebuie furnizate *ad libitum*. În apropierea parturiției, femelele gestante se izolează în cuști speciale de fătare sau maternitate și pot primi materiale pentru construirea culcușului.

Doze

Se utilizează cel puțin trei doze și un lot martor. Dacă pentru administrarea substanței de testat se folosește un vehicul, acesta i se administrează lotului martor în volumul maxim folosit în experiment. Dacă substanța de testat conduce la scăderea consumului zilnic de hrană, ar putea fi necesar un lot martor hrănit identic. În mod ideal, dacă nu există limite impuse de natura fizică/chimică ori de efectele biologice ale substanței de testat, doza maximă trebuie să inducă efecte toxice, dar nu și mortalitate la animalele parentale (P). Doza sau dozele intermediare trebuie să inducă efecte toxice minime atribuibile substanței de testat, iar doza minimă nu trebuie să determine efecte adverse observabile la părinți sau descendenți. Dacă substanța de testat se administrează prin gavaj sau sub formă de capsule, doza trebuie stabilită în funcție de greutatea corporală a fiecărui animal în parte și ajustată săptămânal, în funcție de modificările în greutatea corporală. În cazul femelelor gestante, administrarea dozelor se poate face, dacă se dorește, în funcție de greutatea corporală în ziua 0 sau 6 de graviditate.

Test limită

În cazul substanțelor cu toxicitate scăzută, dacă o doză de cel puțin 1 000 mg/kg nu prezintă nici o interferență asupra capacității de reproducere, continuarea experienței poate fi inutilă. Dacă un studiu preliminar cu doza maximă relevă o toxicitate maternă evidentă, dar nu prezintă efecte adverse asupra fertilității, atunci nu mai sunt necesare studii cu alte doze.

Desfășurarea testului

Schema de tratament

Administrarea tratamentului zilnic la masculii parentali (P) poate începe când aceștia au între cinci și nouă săptămâni, după ce au fost înțărcați și aclimatizați timp de cel puțin cinci zile. La șobolani, administrarea substanței continuă timp de 10 săptămâni înainte de perioada de împerechere (la șoareci, timp de opt săptămâni). Masculii trebuie sacrificați și examinați fie la sfârșitul perioadei de împerechere, fie, alternativ, pot fi păstrați primind regimul alimentar prevăzută în test, în vederea unei împerecheri ulterioare, fiind sacrificați și examinați înainte de terminarea studiului. În cazul femelelor parentale (P), administrarea zilnică trebuie să înceapă după cel puțin cinci zile de aclimatizare și să continue timp de cel puțin două săptămâni înainte de împerechere. Administrarea zilnică a dozei de tratament femelelor P continuă în perioada de trei săptămâni de împerechere, pe parcursul gestației și până la înțărcarea descendenților F1. Se poate avea în vedere modificarea schemei de tratament pe baza altor informații disponibile cu privire la substanța de testat cum ar fi inducerea metabolismului sau bioacumularea.

Modul de împerechere

Pentru studiile de toxicitate privind reproducerea, schemele de împerechere folosite pot fi: un mascul la o femelă 1:1 sau un mascul la două femele 1:2.

În varianta împerecherii 1:1, o femelă este plasată împreună cu același mascul până când se produce fecundarea sau trec trei săptămâni. În fiecare dimineață femelele trebuie examinate pentru a identifica prezența spermei sau a dopului vaginal. Ziua „0" a sarcinii este definită ca fiind ziua în care se identifică prezența dopului vaginal sau a spermei în vagin.

Animalele care nu s-au împerecheat trebuie evaluate pentru a stabili cauza aparentei infertilități. Evaluarea poate presupune posibilități suplimentare de împerechere cu alte exemplare dovedite ca fiind apte, examinarea microscopică a organelor de reproducere, precum și examinarea ciclului estral și a spermatogenezei.

Mărimea seriei de pui

Animalele tratate în timpul studiului de fertilitate fată normal și își cresc puii până la înțărcare, fără a se face o standardizare numerică a seriei de pui.

Dacă are loc standardizarea numerică, se recomandă următoarea metodă. Între zilele 1 și 4 după fătare se ajustează numărul fetilor, eliminând surplusul de pui prin selecție astfel încât să se obțină un număr de patru pui masculi și patru pui femele pentru fiecare serie de pui. Dacă numărul de masculi sau femele fătate nu permite obținerea unui număr de patru pui de fiecare sex, se acceptă ajustarea parțială (de exemplu, cinci masculi și trei femele). Ajustările nu se aplică în cazul seriilor cu mai puțin de opt pui.

Observații

Pe toată durata testului, fiecare animal trebuie observat cel puțin o dată pe zi. Se înregistrează modificările comportamentale semnificative, semnele unor fătări dificile sau prelungite și toate semnele de toxicitate, inclusiv mortalitatea. În timpul perioadelor de pre-împerechere și de împerechere se măsoară zilnic consumul de hrană. După fătare și în perioada lactației, consumul de hrană (și de apă, în cazul în care substanța de testat se administrează în apa de băut) se măsoară în ziua în care se cântăresc puii. Masculii și femelele din generația P se cântăresc în prima zi a tratamentului, apoi săptămânal. Aceste observații se înregistrează pentru fiecare animal adult în parte.

Perioada gestației trebuie calculată din ziua 0 de graviditate. Fiecare serie de pui proveniți de la o gestantă trebuie examinat imediat după naștere, pentru a se stabili numărul și sexul puilor, numărul de pui vii și morți, precum și prezența anomaliilor macroscopice.

Puii morți și puii sacrificați în ziua a patra trebuie conservați și studiați în vederea identificării posibilelor anomalii. Puii vii se numără și se cântăresc în dimineața de după naștere, în ziua a patra și a șaptea, ulterior săptămânal până la încheierea studiului, când animalele se cântăresc individual. Anomaliile fizice sau comportamentale observate la femele sau la descendenți trebuie înregistrate.

Patologie

Autopsia

În momentul sacrificării sau al decesului în timpul studiului, toate animalele din generația P sunt supuse unui examen macroscopic în vederea evidențierii anomaliilor structurale sau a modificărilor patologice, o atenție deosebită acordându-se organelor sistemului de reproducere. Puii muribunzi sau morți se examinează în vederea decelării eventualelor anomalii.

Examen histopatologic

În vederea examinării microscopice, de la toate animalele P se conservă următoarele organe: ovare, uter, cervix, vagin, testicule, epididim, vezicule seminale, prostată, glanda coagulantă, glanda pituitară și organul sau organele țintă. În cazul în care aceste organe nu au fost examinate în cadrul altor studii cu doză multiplă, se efectuează un examen microscopic al tuturor animalelor din lotul martor și din lotul tratat cu doza maximă și, dacă este posibil, al animalelor care mor pe perioada studiului.

Dacă la aceste animale se evidențiază anomalii, organele respective se examinează la toate celelalte animale P. În aceste cazuri, se examinează microscopic toate țesuturile care prezintă modificări patologice macroscopice. După cum s-a arătat în paragraful referitor la modul de împerechere, organele de reproducere ale animalelor suspectate de infertilitate trebuie examinate microscopic.

2. **REZULTATE**

Datele se sistematizează într-un tabel care indică, pentru fiecare lot de experiență, numărul de animale la începutul testului, numărul de masculi fertili, numărul de femele gestante, tipurile de modificări și procentul de animale care prezintă fiecare tip de modificare.

Dacă este posibil, rezultatele se evaluează printr-o metodă statistică adecvată. Poate fi folosită orice metodă statistică recunoscută.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— specia/linia folosită;

— răspunsul toxic pe sexe și doză, inclusiv fertilitatea, gestația și viabilitatea;

— momentul morții în timpul studiului sau indicarea faptului că animalele au supraviețuit studiului;

— tabel cu greutatea corporală pentru fiecare serie de pui, greutatea corporală medie a puilor și greutățile corporale individuale la încheierea studiului;

— efectele toxice sau de alt tip asupra reproducerii, descendenților și evoluției postnatale;

— ziua observării oricărui simptom anormal și evoluția acestuia;

— greutatea corporală a animalelor P;

— rezultatele autopsiei;

— descrierea detaliată a tuturor observațiilor microscopice;

— tratarea statistică a rezultatelor, după caz;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare și interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

STUDIU DE TOXICITATE PRIVIND REPRODUCEREA LA DOUĂ GENERAȚII

1. **METODĂ**

1.1. **Introducere**

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. **Definiții**

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. **Substanțe de referință**

Nici una.

1.4. **Principiul metodei de testare**

Substanța de testat se administrează în doze crescătoare mai multor loturi de masculi și femele. Masculii trebuie tratați în timpul perioadei de creștere și pe durata a cel puțin unui ciclu spermatogen complet (aproximativ 56 de zile la șoarece și 70 de zile la șobolan), astfel încât substanța de testat să își producă efectele adverse asupra spermatogenezei.

Femelele din generația parentală (P) trebuie să fie tratate pe perioada a cel puțin două cicluri estrale complete, astfel încât substanța de testat să producă efectele adverse asupra ciclului estral. Apoi animalele sunt împerecheate. Substanța de testat se administrează ambelor sexe în perioada împerecherii, iar apoi numai femelelor în perioada gestației și a alăptării. După înțărcarea puilor, administrarea substanței de testat continuă la descendenții F_1 pe perioada creșterii până al vârsta adultă, împerechere și producere a generației F_2, până când generația F_2 este înțărcată.

În cazul administrării prin inhalare, metoda trebuie adaptată.

1.5. **Criterii de calitate**

Nici unul.

1.6. **Descrierea metodei de testare**

Pregătire

Înainte de începerea testului, animalele tinere sănătoase se repartizează aleatoriu în loturi tratate și loturi martor. Animalele parentale (P) se țin în condițiile de adăpostire și de alimentare specifice experimentului cel puțin în cele 5 zile care îl preced. Se recomandă ca substanța de testat să se administreze în hrană sau în apa de băut. Și alte căi de administrare sunt acceptabile. Dozele se administrează tuturor animalelor prin aceeași metodă pe tot parcursul experimentului. Dacă se folosește un vehicul sau alți aditivi pentru a facilita administrarea, aceștia trebuie să fie recunoscuți ca neavând efect toxic. Tratamentul se face zilnic, șapte zile pe săptămână.

Animale de experiență: alegerea speciilor

Specia preferată este șoarecele sau șobolanul.

Se folosesc animale P sănătoase, care nu au mai fost supuse altor experimente. Nu se recomandă folosirea liniilor cu fertilitate scăzută. Animalele de experiență trebuie caracterizate în termeni de specie, linie, sex, greutate și/sau vârstă.

Pentru o evaluare corespunzătoare a fertilității, se studiază atât femele cât și masculi. Toate animalele tratate și cele martor trebuie înțărcate înainte de a începe tratamentul.

Număr și sex

Fiecare lot martor și fiecare lot tratat trebuie să conțină suficiente animale pentru a se asigura un număr de 20 de femele gestante în momentul sau aproape de momentul parturiției. Obiectivul este acela de a avea un număr suficient de femele gestante și descendenți pentru a asigura o evaluare reprezentativă a potențialului substanței de testat de a afecta fertilitatea, gestația și comportamentul matern la animalele din generația P, precum și suptul, creșterea și dezvoltarea la descendenții F_1, de la concepție până la maturitate și dezvoltarea descendenților lor (F_2), până la înțărcare.

Condiții experimentale

Hrana și apa trebuie să fie disponibile *ad libitum*. În apropierea parturiției, femelele gestante se izolează în cuști speciale de fătare sau maternitate și pot primi materiale pentru construirea culcușului.

Doze

Se utilizează cel puțin trei loturi tratate și un lot martor. Dacă pentru administrarea substanței de testat se folosește un vehicul, acesta i se administrează lotului martor în volumul maxim folosit în experiment. Dacă substanța de testat conduce la scăderea consumului zilnic de hrană, ar putea fi necesar un lot martor hrănit identic. În mod ideal, dacă nu există limite impuse de natura fizică/chimică ori de efectele biologice ale substanței de testat, doza maximă trebuie să producă efecte toxice dar nu și mortalitate la animalele parentale (P). Doza sau dozele intermediare trebuie să inducă efecte toxice minime atribuibile substanței de testat, iar doza minimă nu trebuie să determine efecte adverse observabile la părinți sau descendenți. Dacă substanța de testat se administrează prin gavaj sau sub formă de capsule, doza administrată fiecărui animal trebuie stabilită în funcție de greutatea corporală a fiecărui animal în parte și ajustată săptămânal în funcție de modificările în greutatea corporală. În cazul femelelor gestante, administrarea dozelor se poate face, dacă se dorește, în funcție de greutatea corporală în ziua 0 sau 6 de graviditate.

Test limită

În cazul substanțelor cu toxicitate scăzută, dacă o doză de cel puțin 1 000 mg/kg nu prezintă nici o interferență asupra capacității de reproducere, studiile la alte doze pot fi considerate inutile. Dacă un studiu preliminar la doza maximă, care relevă o toxicitate maternă evidentă, nu prezintă efecte adverse asupra fertilității, atunci nu mai sunt necesare studii la alte doze.

Desfășurarea testului

Schema de tratament

Administrarea tratamentului zilnic la masculii parentali (P) poate începe când aceștia au între cinci și nouă săptămâni, după ce au fost înțărcați și aclimatizați timp de cel puțin cinci zile. La șobolani, administrarea substanței continuă timp de 10 săptămâni înainte de perioada de împerechere (iar la șoareci timp de opt săptămâni). Masculii trebuie sacrificați și examinați fie la sfârșitul perioadei de împerechere fie, alternativ, pot fi păstrați primind regimul alimentar prevăzut în test, în vederea unei împerecheri ulterioare, fiind sacrificați și examinați înainte de terminarea experimentului.

În cazul femelelor parentale (P), administrarea zilnică trebuie să înceapă după cel puțin cinci zile de aclimatizare și să continue timp de cel puțin două săptămâni înainte de împerechere. Administrarea zilnică a dozei de tratament femelelor P continuă în perioada de trei săptămâni de împerechere, pe parcursul gestației și până la înțărcarea descendenților F_1. Se poate avea în vedere modificarea schemei de tratament pe baza altor informații disponibile cu privire la substanța de testat, cum ar fi inducerea metabolismului sau bioacumularea.

Tratamentul animalelor F_1 începe odată cu înțărcarea și se termină în momentul sacrificării.

Modul de împerechere

Pentru studiile de toxicitate privind reproducerea, schemele de împerechere folosite pot fi: un mascul la o femelă (1:1) sau un mascul la două femele (1:2).

În varianta împerecherii 1:1, o femelă este plasată împreună cu același mascul până când se produce fecundarea sau trec trei săptămâni. În fiecare dimineață femelele trebuie examinate pentru a identifica prezența spermei sau a dopului vaginal. Ziua 0 a sarcinii este definită ca fiind ziua în care se identifică prezența dopului vaginal sau a spermei în vagin. Luând în considerare procesul de spermatogeneză, descendenții F_1 nu trebuie împerecheați până când nu împlinesc vârsta de 11 săptămâni, în cazul șoarecilor, și 13 săptămâni, în cazul șobolanilor. Pentru împerecherea descendenților F_1, câte un mascul și o femelă de la fiecare mamă sunt aleși aleatoriu din fiecare serie de pui pentru împerechere încrucișată cu câte un pui rezultat de la altă mamă din același lot tratat cu aceeași doză pentru a produce generația F_2. Masculii și femelele F_1 care nu au fost selectați pentru împerechere sunt sacrificați la înțărcare.

Cuplurile de animale care nu s-au împerecheat trebuie evaluate pentru a stabili cauza aparentei infertilități. Evaluarea poate presupune proceduri care permit condiții suplimentare de împerechere cu exemplare dovedite ca fiind apte de a procrea, examinarea microscopică a organelor de reproducere, precum și examinarea ciclului estral și a spermatogenezei.

Mărimea seriei de pui

Animalele tratate în timpul studiului de fertilitate fată normal și își cresc puii până la înțărcare, fără a se face o standardizare numerică a seriei de pui fătați.

Dacă are loc standardizarea numerică, se recomandă următoarea metodă. Între zilele 1 și 4 după fătare se ajustează numărul fetilor, eliminându-se surplusul de pui prin selecție astfel încât să se obțină un număr de patru pui masculi și patru pui femele pentru fiecare serie de pui. Dacă numărul de masculi sau femele fătate nu permite obținerea unui număr de patru pui de fiecare sex, se acceptă ajustarea parțială (de exemplu, cinci masculi și trei femele). Ajustările nu se aplică în cazul seriilor cu mai puțin de opt pui. Standardizarea seriilor de pui F_2 se desfășoară în același mod.

Observații

Pe toată durata testului, fiecare animal trebuie observat cel puțin o dată pe zi. Se înregistrează modificările comportamentale semnificative, semnele unor fătări dificile sau prelungite, toate semnele de toxicitate, inclusiv mortalitatea. În perioadele de pre-împerechere și împerechere se măsoară săptămânal consumul de hrană. Opțional, în timpul graviditații, consumul de hrană poate fi măsurat zilnic. După fătare și în perioada lactației, consumul de hrană (și de apă, în cazul în care substanța de testat se administrează în apa de băut) se măsoară în ziua în care se cântăresc puii. Animalele parentale (P și F_1) se cântăresc în prima zi a tratamentului, apoi săptămânal. Aceste observații se înregistrează pentru fiecare animal adult în parte.

Perioada gestației trebuie calculată din ziua 0 de graviditate. Fiecare serie de pui trebuie examinată imediat cât mai curând posibil după naștere, pentru a se stabili numărul și sexul puilor, numărul de pui vii și morți, precum și prezența anomaliilor macroscopice.

Puii morți și puii sacrificați în ziua a patra trebuie conservați și studiați în vederea identificării posibilelor defecte. Puii vii se numără și se cântăresc în dimineața de după naștere, în ziua a patra și a șaptea, iar ulterior săptămânal până la încheierea studiului, când animalele se cântăresc individual. Anomaliile fizice sau comportamentale observate la femele sau la descendenți trebuie înregistrate.

Patologie

Autopsia

Toate animalele adulte P și F_1 trebuie sacrificate în momentul în care nu mai sunt necesare, în vederea evaluării efectelor reproductive. Descendenții F_1 care nu sunt selectați în vederea reproducerii, precum și toți descendenții F_2 trebuie sacrificați în momentul înțărcării.

În momentul sacrificării sau al decesului în timpul studiului, toate animalele parentale (P și F_1) sunt supuse unui examen microscopic în vederea evidențierii anomaliilor structurale sau a modificărilor patologice, o atenție deosebită acordându-se organelor sistemului de reproducere. Puii muribunzi sau morți se examinează în vederea decelării eventualelor anomalii.

Examen histopatologic

În vederea examinării microscopice, de la toate animalele P și F_1 se conservă următoarele organe: ovare, uter, cervix, vagin, testicule, epididim, vezicule seminale, prostată, glanda coagulantă, glanda pituitară și organul sau organele țintă. În cazul în care aceste organe nu au fost examinate în cadrul altor studii cu doză multiplă, se efectuează un examen microscopic al tuturor animalelor P și F_1 selectate pentru împerechere din lotul martor și din lotul tratat cu doza maximă și, dacă este posibil, al animalelor care mor pe parcursul studiului. Dacă la aceste animale se evidențiază anomalii, organele respective se examinează la animalele din loturile tratate cu alte doze. În aceste cazuri, se examinează microscopic toate țesuturile care prezintă modificări patologice macroscopice. După cum se sugerează în procedurile de împerechere, organele de reproducere ale animalelor suspectate de infertilitate trebuie examinate microscopic.

2. **DATE**

Prelucrarea rezultatelor

Datele se sistematizează într-un tabel care indică, pentru fiecare lot de experiență, numărul de animale la începutul testului, numărul de masculi fertili, numărul de femele gestante, tipurile de modificări și procentul de animale care prezintă fiecare tip de modificare.

Dacă este posibil, rezultatele se evaluează printr-o metodă statistică adecvată. Poate fi folosită orice metodă statistică recunoscută.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— specia/linia folosită;

— răspunsul toxic pe sexe și doză, inclusiv indicii de fertilitate, gestație și viabilitate;

— momentul morții în timpul studiului sau indicarea faptului că animalele au supraviețuit studiului;

— tabel cu greutatea corporală pentru fiecare serie de pui, greutatea corporală medie a puilor și greutățile corporale individuale la încheierea studiului;

— efectele toxice sau de alt tip asupra reproducerii, descendenților și evoluției postnatale;

— momentul observării oricărui simptom anormal și evoluția acestuia;

— greutatea corporală a animalelor P și F_1 selecționate pentru împerechere;

— rezultatele autopsiei;

— descrierea detaliată a tuturor observațiilor microscopice;

— tratarea statistică a rezultatelor, după caz;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare și interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

TOXICOCINETICA

1. METODĂ

1.1. Introducere

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. Definiții

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. Substanțe de referință

Nici una.

1.4. Principiul metodei de testare

Substanța de testat se administrează pe calea corespunzătoare. În funcție de scopul studiului, substanța poate fi administrată în doză unică sau în doze repetate, pe anumite perioade de timp determinate, pe unul sau mai multe loturi de animale. Ulterior, în funcție de tipul studiului, se vor determina substanța și/sau metaboliții acesteia în fluidele corpului, în țesuturi și/sau în produsele de excreție.

Studiile pot fi făcute cu forme ale substanței de testat „nemarcate" sau „marcate". În cazul în care se utilizează un marcaj, acesta trebuie poziționat în substanță în așa fel încât să furnizeze maximul de informații cu privire la evoluția compusului.

1.5. Criterii de calitate

Nici unul.

1.6. Descrierea metodei de testare

Pregătirea testului

Animalele tinere adulte, sănătoase, sunt aclimatizate la condițiile de laborator cu cel puțin cinci zile înainte de începerea experimentului. Înainte de testare, animalele sunt repartizate aleatoriu în loturile de tratament. În situații speciale, se pot utiliza animale foarte tinere, femele gestante sau animale pretratate.

Condiții experimentale

Animale de experiență

Studiile de toxicocinetică se efectuează pe una sau mai multe specii adecvate și trebuie să ia în considerare speciile folosite sau care urmează să fie folosite în alte studii toxicologice pentru aceeași substanță. Dacă pentru un test se folosesc rozătoare, diferența de greutate între animale nu trebuie să depășească cu mai mult de ± 20 % valoarea medie.

Număr și sex

Pentru studiile de absorbție sau excreție, fiecare lot tratat trebuie să cuprindă inițial patru animale. Alegerea în funcție de sexe nu este obligatorie, dar în anumite circumstanțe ar putea fi necesară studierea animalelor de ambele sexe. Dacă răspunsul la substanța de testat diferă în funcție de sex, trebuie testate câte patru animale din fiecare sex. În cazul studiilor pe nerozătoare, se pot utiliza mai puține animale.

În studiile privind distribuția tisulară, pentru stabilirea mărimii inițiale a lotului se va ține seama de numărul de animale care trebuie sacrificate la fiecare dată fixată pentru examinare, precum și de numărul preconizat de examinări.

Dacă se studiază metabolismul, mărimea lotului depinde de cerințele studiului.

În cazul studiilor cu doze multiple și cu examene intermediare multiple, mărimea lotului se stabilește în funcție de numărul de examinări și sacrificări planificate, însă nu trebuie să fie mai mică de două animale. Mărimea lotului trebuie să fie suficientă pentru a permite o evaluare acceptabilă a absorbției, platoului și depleției (după caz) substanței de testat și/sau ale metaboliților.

Doze

În cazul administrării unei doze unice, se utilizează cel puțin două niveluri. Se utilizează o doză mică, la care să nu se observe efecte toxice și o doză mare, la care pot să apară modificări ale parametrilor toxicocinetici sau la care apar efecte toxice.

În cazul administrării dozelor repetate, doza mică este, de obicei, suficientă, însă în anumite circumstanțe poate fi necesară și o doză mare.

Calea de administrare

În studiile de toxicocinetică se folosește aceeași cale și, după caz, același vehicul ca în celelalte studii de toxicitate. Substanța de testat se administrează loturilor de animale de experiență oral, prin gavaj sau în hrană, prin inhalații sau aplicații cutanate, pe perioade prestabilite. Administrarea intravenoasă a substanței de testat poate fi utilă în determinarea absorbției pe alte căi, pentru comparație. În plus, se pot afla informații importante asupra modului de distribuție imediat după administrarea intravenoasă a substanței.

Se ia în considerare posibilitatea interferenței dintre substanța de testat și vehicul. O atenție deosebită trebuie acordată diferențelor de absorbție dintre administrarea prin gavaj și cea prin hrană, precum și necesității de a stabili doza cu acuratețe, în special atunci când substanța de testat se administrează în hrană.

Perioada de observație

Toate animalele trebuie observate zilnic, înregistrându-se semnele de toxicitate și alte particularități clinice, momentul apariției, amploarea și durata acestora.

Mod de operare

După cântărirea animalelor de experiență, substanța se administrează pe o cale adecvată. Dacă se consideră relevant, animalele pot fi private de hrană înainte de administrarea substanței.

Absorbția

Nivelul și gradul de absorbție a substanței administrate pot fi evaluate folosind metode variate, cu sau fără lot de referință ([1]), de exemplu, prin:

— stabilirea cantității de substanță de testat și/sau a metaboliților în produse de excreție cum ar fi: urina, bilă, fecale, aerul expirat și rezidual;

— compararea răspunsului biologic (ex. studii de toxicitate acută) între loturile tratate, martor și/sau de referință;

— compararea cantității de substanță excretată pe cale renală și/sau a metaboliților la loturile tratate și de referință;

— determinarea ariei de sub curbă formată concentrația plasmă/timp a substanței și/sau metaboliților, comparativ cu datele obținute de la lotul de referință.

([1]) În această metodă, prin lot de referință se înțelege un lot căruia substanța de testat i se administrează pe o altă cale garantându-se o disponibilitate completă a dozei.

Distribuția

În prezent, sunt disponibile două metodologii pentru analizarea modelelor de distribuție:

— obținerea de informații calitative utile folosind tehnici autoradiografice ale întregului corp;

— obținerea de informații cantitative prin sacrificarea animalelor la momente diferite după expunere și determinarea concentrației și cantității totale de substanță și/sau metaboliți în țesuturi și organe.

Excreția

În studiile de excreție se colectează: urină, fecale, aer expirat și, în anumite circumstanțe, bilă. Cantitatea de substanță de testat și/sau metaboliții în aceste produse de excreție se măsoară de mai multe ori după administrare, până când aproximativ 95 % din doza administrată a fost excretată timp de șapte zile, dacă procentul menționat nu a fost atins înainte de acest termen.

În cazuri speciale, se poate determina excreția substanței în secreția lactată a animalelor de experiență care alăptează.

Metabolism

Pentru a se stabili calea metabolică și intensitatea metabolismului, probele biologice se analizează prin utilizarea unor tehnici corespunzătoare. Atunci când se caută răspuns la unele întrebări ridicate în studii toxicologice anterioare, trebuie elucidate structurile metaboliților și sugerate căile metabolice adecvate. Ar putea fi utilă efectuarea de studii *in vitro* în vederea obținerii de informații cu privire la căile metabolice.

Informații suplimentare despre relația dintre metabolism și toxicitate pot fi obținute prin studii biochimice, cum ar fi cele referitoare la determinarea efectelor asupra sistemelor enzimatice metabolizante, depleția din compușii endogeni a grupărilor sulfhidril non-proteice și stabilirea legăturii chimice dintre substanță și macromolecule.

2. **DATE**

În funcție de tipul studiului realizat, rezultatele sunt sistematizate sub formă de tabele însoțite, după caz, de grafice. Pentru fiecare lot tratat se vor specifica media și variația statistică a măsurătorilor în raport cu timpul, doza, țesuturile și organele, după caz. Gradul de absorbție și cantitatea și ritmul excreției se stabilesc prin metode corespunzătoare. Dacă se realizează studii de metabolism, se indică structura metaboliților identificați și căile metabolice posibile.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

În funcție de tipul de studiu realizat, raportul de testare trebuie să cuprindă următoarele informații:

— specia, linia, sursa, condițiile ambiante, regimul alimentar;

— caracterizarea materialelor folosite pentru marcare, după caz;

— dozele și intervalele de administrare folosite;

— calea sau căile de administrare și vehiculul folosit;

— efectele toxice sau de alt tip;

— metodele pentru determinarea substanței de testat și/sau metaboliți din probele biologice, inclusiv din aerul expirat;

— prezentarea sub formă de tabele a măsurătorilor în funcție de sex, doză, regim, moment, țesuturi și organe;

— prezentarea gradului de absorbție și excreție în funcție de timp;

— metodele pentru caracterizarea și identificarea metaboliților din probele biologice;

— metodele biochimice referitoare la metabolism;

— căile de metabolizare propuse;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare şi interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

TESTE DE MUTAGENEZĂ ȘI DE DEPISTARE A CANCEROGENEZEI

MUTAȚIA GENICĂ – *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. METODĂ

1.1. Introducere

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. Definiție

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. Substanțe de referință

Nici una.

1.4. Principiul metodei de testare

Pentru a măsura producerea mutațiilor genice induse de agenți chimici, cu sau fără activare metabolică, pot fi folosite diverse sușe haploide și diploide ale drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*.

Au fost utilizate metode de producere a mutațiilor directe în sușe haploide, cum ar fi măsurarea transformării din mutanți roșii, care au nevoie de adenină (*ade*-1, *ade*-2), în mutanți albi cu nevoi duble de adenină, și metode selective cum ar fi inducerea rezistenței la canavnaină și cicloheximidă.

Cel mai folosit sistem de mutație inversă validat presupune folosirea sușei haploide XV 185-14C, care conține mutații nonsens de codon *ade* 2-1, *arg* 4-17, *lys* 1-1 și *trp* 5-48, reversibile prin acțiunea agenților mutageni responsabili de substituția de bază, care induc mutații într-un situs specific sau mutații supresive de codon. Sușa XV 185-14C conține, de asemenea, markerul *his* 1-7 cu o mutație cu sens greșit inversată, în special prin mutații în al doilea situs, și markerul *hom* 3-10 care este inversat de agenți mutageni care conduc la decalarea cadrului de citire a codului genetic (*frameshift mutagens*).

Dintre sușele diploide de *Saccharomyces cerevisiae*, singura sușă folosită pe scară largă este D_7, care este homozigotă pentru *ilv* 1-92.

1.5. Criterii de calitate

Nici unul.

1.6. Descrierea metodei de testare

Pregătire

Soluțiile substanțelor de testare, precum și soluțiile martor trebuie să fie preparate imediat înaintea testării, utilizându-se un vehicul corespunzător. În cazul compușilor organici insolubili în apă, trebuie să se utilizeze soluții de cel mult 2 % v/v solvenți organici cum ar fi etanolul, acetona sau dimetilsulfoxidul (DMSO). Concentrația finală a vehiculului nu trebuie să afecteze semnificativ viabilitatea celulară și caracteristicile de creștere.

Activare metabolică

Celulele trebuie expuse la substanțele de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem exogen de activare metabolică.

Cel mai utilizat sistem este o fracțiune postmitocondrială suplimentată cu un cofactor preparat din ficatul de rozătoare tratate cu inductori enzimatici. Pentru activarea metabolică, pot fi folosite și alte specii, țesuturi, fracțiuni postmitocondriale sau alte metode.

Condiții experimentate

Suș e testate

Suș ele cel mai des utilizate în studiile de mutageneză sunt suș a haploidă XV 185-14C și suș a diploidă D7. Se pot utiliza și alte suș e.

Medii de cultură

Pentru stabilirea numărului de colonii supraviețuitoare și mutante sunt utilizate medii de cultură corespunzătoare.

Utilizarea martorilor negativi și pozitivi

Martorii pozitivi, cei netratați și cei tratați cu solvent trebuie preparați simultan. Pentru fiecare mecanism mutagen specific se folosesc substanțe martor pozitiv adecvate.

Concentrația de expunere

Trebuie folosite cel puțin cinci concentrații ale substanței de testat, cu intervale corespunzătoare între acestea. În cazul substanțelor toxice, cea mai mare concentrație testată nu trebuie să reducă supraviețuirea la mai puțin de 5 – 10 %. Substanțele relativ insolubile în apă se testează până la limita de solubilitate, folosindu-se metode adecvate. Pentru substanțele netoxice cu un grad ridicat de solubilitate în apă, limita superioară a concentrației se determină de la caz la caz.

Condiții de incubare

Cutiile se incubează timp de 4 – 7 zile, la o temperatură de 28 – 30 °C, la întuneric.

Frecvențele mutațiilor spontane

Se folosesc subculturi celulare cu o frecvență a mutațiilor spontane în limitele normale admise.

Numărul replicilor

Pentru analiza prototrofilor produși prin mutageneză și a viabilității celulare se utilizează cel puțin trei replici pentru fiecare concentrație. În cazul experimentelor în care se utilizează markeri cum ar fi *hom* 3-10 cu o rată scăzută a mutațiilor, numărul replicilor trebuie să crească, astfel încât să se poată obține rezultate relevante din punct de vedere statistic.

Mod de operare

Tratamentul suș elor de *Saccharomices cerevisiae* se realizează de obicei printr-o metodă de testare în lichid care presupune utilizarea fie de celule staționare, fie de celule în creștere. Experimentele inițiale trebuie realizate pe celule în creștere: 1 – 5 x 10^7 celule/ml sunt expuse la substanța chimică de testat pe o perioadă de 18 ore, la o temperatură de 28 – 37 °C, cu agitare; dacă este necesar; pe parcursul expunerii, se adaugă o cantitate corespunzătoare de sistem de activare metabolică. La sfârșitul tratamentului, celulele sunt centrifugate, spălate și însămânțate pe un mediu de cultură potrivit. După incubare, plăcile sunt inventariate în vederea stabilirii ratei de supraviețuire și a mutațiilor genice produse.

Dacă primul experiment este negativ, trebuie realizat un al doilea experiment, folosind celule în fază staționară. Dacă primul experiment este pozitiv, acesta trebuie confirmat printr-un experiment independent adecvat.

2. **DATE**

Datele se prezintă într-un tabel, indicându-se numărul coloniilor, numărul mutanților, nivelul de supraviețuire și frecvența mutanților. Toate rezultatele trebuie confirmate printr-un experiment independent. Toate rezultatele observate se evaluează cu ajutorul unei metode statistice adecvate.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— sușele folosite;

— condițiile experimentale: celule în faza staționară sau celule în creștere, compoziția mediilor de cultură, temperatura de incubare și durata acesteia, sistemul de activare metabolică;

— condițiile de tratament: niveluri de expunere, metoda și durata tratamentului, temperatura la care se realizează tratamentul, martori pozitivi și negativi;

— numărul coloniilor, numărul mutanților, nivelul de supraviețuire și frecvența mutanților, relația doză/răspuns (după caz), evaluarea statistică a datelor;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare și interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

RECOMBINAREA MITOTICĂ -*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. METODĂ

1.1. Introducere

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. Definiție

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. Substanțe de referință

Nici una.

1.4. Principiul metodei de testare

La *Saccharomyces cerevisiae* se poate decela recombinarea mitotică intergenică (sau, mai general, între o genă și centromerul său) și intragenică. Prima situație este denumită *crossing-over* mitotic și dă naștere unor schimburi reciproce de material genetic, în timp ce a doua situație, în care schimburile sunt, cel mai adesea, nereciproce, este denumită conversie genică. *Crossing-over*-ul se determină, în general, prin producerea de colonii homozigote recesive sau sectoare produse într-o sușă heterozigotă, în timp ce conversia genică se determină prin producerea de revertanți prototrofici într-o sușă auxotrofică heteroalelică, purtătoare a două alele defective diferite ale aceleiași gene. Sușele cele mai folosite la decelarea conversiei genice mitotice sunt D_4 (heteroalelică la *ade* 2 și *trp* 5), D_7 (heteroalelică la *trp* 5), BZ_{34} (heteroalelică la *arg* 4) și JD1 (heteroalelică la *his* 4 și *trp*5). *Crossing-over*-ul mitotic care produce sectoare homozigote roșu și roz poate fi analizat în D_5 sau în D_7 (care măsoară, de asemenea, conversia genică mitotică și mutația inversă la *ilv* 1-92), ambele suș e fiind heteroalelice pentru alelele complementare ale *ade* 2.

1.5. Criterii de calitate

Nici unul.

1.6. Descrierea metodei de testare

Pregătire

Soluțiile substanțelor chimice de testat și ale compușilor martor sau de referință trebuie preparate chiar înaintea testării, folosind un vehicul corespunzător. În cazul compușilor organici insolubili în apă, trebuie utilizate soluții de cel mult 2 % v/v de solvenți organici cum ar fi etanolul, acetona sau dimetilsulfoxidul (DMSO). Concentrația finală a vehiculului nu trebuie să afecteze semnificativ viabilitatea celulară și caracteristicile de creștere.

Activare metabolică

Celulele trebuie să fie expuse la substanțele chimice de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem exogen adecvat de activare metabolică. Sistemul folosit cel mai des este o fracțiune postmitocondrială suplimentată cu un cofactor preparat din ficatul de rozătoare tratate cu inductori enzimatici. Pentru activarea metabolică pot fi utilizate și alte specii, țesuturi, fracțiuni postmitocondriale sau alte metode.

Condițiile de desfășurare a testului

Suș e testate

Sușele cel mai frecvent utilizate sunt cele diploide D_4, D_5, D_7 și JD1. Pot fi utilizate și alte suș e.

Medii de cultură

Pentru a determina nivelul de supraviețuire și frecvența recombinărilor mitotice se utilizează medii de cultură adecvate.

Folosirea martorilor negativi și pozitivi

Martorii pozitivi, cei netratați și cei tratați cu solvent, trebuie preparați simultan. Pentru fiecare tip specific de recombinare se folosesc substanțe martor pozitiv adecvate.

Concentrații de expunere

Trebuie realizate cel puțin cinci concentrații ale substanței de testat, cu intervale corespunzătoare între acestea. Printre factorii care trebuie luați în considerare se numără citotoxicitatea și solubilitatea. Concentrația minimă nu trebuie să afecteze viabilitatea celulară. În cazul substanțelor toxice, cea mai mare concentrație testată nu trebuie să reducă supraviețuirea la mai puțin de 5 – 10 %. Substanțele relativ insolubile în apă trebuie să fie testate până la limita solubilității, folosindu-se metode adecvate. În cazul substanțelor netoxice cu un grad ridicat de solubilitate în apă, limita superioară a concentrației se determină de la caz la caz.

Celulele pot fi expuse la substanțele chimice de testat fie în faza staționară, fie în faza creșterii, pentru perioade de până la 18 ore. În cazul perioadelor lungi de tratament, culturile trebuie studiate microscopic în vederea decelării formării sporilor, prezența acestora invalidând testul.

Condiții de incubare

Plăcile se incubează între 4 și 7 zile la o temperatură de 28 – 30 °C, la întuneric. Plăcile utilizate pentru determinarea sectoarelor homozigote roșu și roz produse prin crossing-over mitotic se păstrează în frigider la aproximativ 4 °C timp de una-două zile înaintea numărării, pentru a permite dezvoltarea de colonii pigmentate corespunzătoare.

Frecvențele recombinării mitotice spontane

Se utilizează subculturi cu o frecvență a mutațiilor spontane care se situează în limitele normale admise.

Numărul replicilor

Se utilizează cel puțin trei plăci pe concentrație pentru analiza prototrofilor produși prin conversia genică mitotică și pentru analiza viabilității. În cazul analizei homozigotismului recesiv produs prin crossing-over mitotic, numărul plăcilor trebuie să crească, astfel încât să furnizeze un număr corespunzător de colonii.

Mod de operare

Tratamentul sușelor de *Saccharomices cerevisiae* se realizează de obicei printr-o metodă de testare în lichid, care presupune utilizarea fie de celule staționare, fie de celule în creștere. Experimentele inițiale trebuie realizate pe celule în creștere. 1 – 5 x 10^7 celule/ml sunt expuse la substanța chimică de estat pe o perioadă de 18 ore, la o temperatură de 28 – 37 °C, cu agitare; după caz, pe parcursul tratamentului, se adaugă o cantitate corespunzătoare de sistem de activare metabolică.

La sfârșitul tratamentului celulele sunt centrifugate, spălate și însămânțate pe un mediu de cultură potrivit. După incubare, plăcile sunt examinate în vederea stabilirii nivelului de supraviețuire și inducerea recombinării mitotice

Dacă primul experiment este negativ, trebuie realizat un al doilea experiment în care se utilizează celule în fază staționară. Dacă primul experiment este pozitiv, acesta trebuie confirmat printr-un experiment independent corespunzător.

2. **DATE**

Datele se prezintă sub formă de tabele în care se indică numărul coloniilor numărate, numărul recombinanților, nivelul de supraviețuire și frecvența recombinanților.

Toate rezultatele trebuie confirmate printr-un experiment independent.

Datele se evaluează prin metode statistice corespunzătoare.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— sușele folosite;

— condițiile experimentale: celule în faza staționară sau în faza de creștere, compoziția mediilor de cultură, temperatura de incubare și durata acesteia, sistemul de activare metabolică;

— condițiile de tratament: concentrațiile de expunere, procedura și durata tratamentului, temperatura la care se realizează tratamentul, martorii pozitivi și negativi;

— numărul coloniilor, numărul recombinanților, nivelul de supraviețuire și frecvența recombinării, relația doză/răspuns (după caz), evaluarea statistică a datelor;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare și interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

TEST *IN VITRO* DE MUTAȚIE GENICĂ PE CELULE DE MAMIFERE

1. METODĂ

1.1. Introducere

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. Definiție

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. Substanțe de referință

Nici una.

1.4. Principiul metodei de testare

Pentru determinarea mutațiilor cauzate de substanțele chimice se pot folosi sisteme de culturi celulare de mamifere. Printre cele mai utilizate linii celulare se numără celulele limfomatoase L5178Y de șoarece și liniile celulare CHO și V-79 de hamster chinezesc. În aceste linii celulare, sistemele cele mai utilizate măsoară mutațiile la loci ai timidin kinazei (TK), hipoxantin guanin fosforibozil transferazei (HPRT) ([1]) și Na^+/K^+ ATP-azei; sistemele mutaționale TK și HPRT decelează mutațiile de perechi de baze, mutațiile cadrului de citire și deleții mici. Sistemul Na^+/K^+ ATP-azei detectează numai mutații de perechi de baze.

Celulele deficiente în timidin kinază (TK), datorită mutației directe $TK^+ \rightarrow TK^-$ sunt rezistente la bromodeoxiuridină (BrdU), fluorodeoxiuridină (FdU) sau trifluorotimidină (TFT), deoarece acești antimetaboliți nu sunt încorporați în nucleotidele celulare de către sistemul enzimatic „de salvare" al timidin kinazei; nucleotidele necesare pentru metabolismul celular se obțin exclusiv prin sinteza *de novo*. Cu toate acestea, în prezența timidin kinazei, BrdU, FdU sau TFT sunt încorporate în nucleotide, rezultând inhibiția metabolismului celular și citotoxicitate. Astfel, celulele mutante sunt capabile de proliferare în prezența BrdU, FdU sau TFT, în timp ce celulele normale, care conțin timidin kinază, nu sunt capabile de proliferare. În mod similar, celulele deficiente în HPRT sunt selecționate prin rezistența la 8-azaguanină (AG) sau 6-tioguanină (TG). Celulele care au sistemul Na^+/K^+ ATP-ază alterat sunt selecționate prin rezistența la ouabaină.

Citotoxicitatea se stabilește prin măsurarea efectelor materialului testat asupra capacității de formare de colonii (eficiența de clonare) sau rata de creștere a culturilor. Frecvența mutanților se stabilește prin cultivarea unui număr cunoscut de celule într-un mediu care conține agentul selectiv, pentru decelarea celulelor mutante, iar într-un mediu fără agent selectiv, pentru aflarea numărului de celule supraviețuitoare. După o perioadă de incubare corespunzătoare, se numără coloniile. Frecvența mutanților se calculează din numărul de colonii mutante corectat în funcție de supraviețuirea celulară.

1.5. Criterii de calitate

Nici unul.

1.6. Descrierea metodei de testare

Pregătire

Celule

Pentru această tehnică sunt disponibile mai multe linii celulare. Acestea includ subclonele L5178Y, celulele CHO sau celulele V-79, care au o sensibilitate demonstrată la agenții chimici mutageni, o eficiență de clonare ridicată și o frecvență redusă a mutațiilor spontane. Celulele pot fi analizate periodic pentru verificarea stabilității cariotipului și se examinează în vederea decelării contaminării cu micoplasmă. Pentru mutațiile genice cauzate de substanțele chimice se pot utiliza și alte tipuri de celule, cu condiția ca validitatea utilizării în acest scop să fie pe deplin argumentată cu documentație.

([1]) Anterior HGPRT.

Mediu

Se utilizează medii de cultură și condiții de incubare corespunzătoare (de exemplu, temperatura, vasele de cultură folosite, concentrațiile de CO_2 și umiditatea). Mediul și serul trebuie alese funcție de sistemele selective și tipul celular folosit în experiment.

Substanța de testat

Înainte de tratarea celulelor, substanța de testat fie poate fi preparată în mediul de cultură, fie poate fi dizolvată sau suspensionată într-un vehicul corespunzător. Concentrația finală a vehiculului în sistemul de cultură nu trebuie să afecteze viabilitatea sau rata de creștere celulară.

Activarea metabolică

Celulele se tratează cu substanța de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem exogen adecvat de activare metabolică la mamifere. Dacă se folosesc celule cu activitate metabolică intrinsecă, trebuie să se cunoască intensitatea și natura acestei activități, astfel încât să corespundă clasei de substanțe chimice care se testează.

Condiții experimentale

Folosirea martorilor pozitivi și negativi

Fiecare experiment include martori pozitivi, utilizându-se atât un compus cu acțiune directă, cât și un compus ce necesită activare metabolică; de asemenea, se utilizează și un martor negativ (vehicul).

Exemple de substanțe ce pot fi folosite ca martor pozitiv:

— compuși cu acțiune directă:

  — etilmetansulfonatul;

  — hicantona;

— compuși cu acțiune indirectă:

  — 2-acetilaminofluoren;

  — 7,12-dimetilbenzantracenul;

  — N-nitrozodimetilamina.

Dacă este necesar, poate fi inclus un martor pozitiv suplimentar, care să aparțină aceleiași clase de substanțe ca substanța de testat.

Concentrațiile de expunere

Trebuie folosite mai multe concentrații ale substanței de testat. Acestea trebuie alese astfel încât să producă efect toxic în raport cu concentrația, concentrația maximă determinând un nivel scăzut de supraviețuire, iar supraviețuirea la concentrația minimă fiind aproximativ aceeași cu cea de la martorul negativ.

Substanțele relativ insolubile în apă trebuie testate până la limita superioară a solubilității, prin metode corespunzătoare. Pentru substanțele netoxice ușor solubile în apă, limita maximă a concentrației se stabilește de la caz la caz.

Mod de operare

Alegerea numărului de celule utilizate pe cultură se face în funcție de frecvența mutațiilor spontane; regula generală constă în utilizarea unui număr de celule viabile care să fie de 10 ori inversul frecvenței mutațiilor spontane.

Celulele trebuie expuse o perioadă corespunzătoare, în cele mai multe cazuri fiind suficiente două până la cinci ore. Celulele fără o activitate metabolică intrinsecă suficientă trebuie expuse la substanța de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem adecvat de activare metabolică. La sfârșitul perioadei de expunere, celulele sunt spălate în vederea îndepărtării substanței de testat și cultivate pentru determinarea viabilității și pentru a permite expresia fenotipului mutant.

La sfârșitul perioadei de expresie, care trebuie să fie suficientă pentru a permite expresia fenotipică optimă a mutanților induși, celulele vor crește în mediu de cultură cu și fără agenți selectivi, pentru determinarea numărului de mutanți și a viabilității.

Toate rezultatele se verifică într-un experiment independent.

2. **DATE**

Datele se sistematizează în tabele. Se indică numărul de celule pe fiecare placă pentru substanța de testat și martori, atât în ceea ce privește inducerea mutațiilor, cât și supraviețuirea. Se prezintă, de asemenea, numărul mediu de colonii per placă și deviația standard. Frecvența mutațiilor trebuie exprimată ca număr de celule mutante raportat la numărul de celule supraviețuitoare. Eficiența de clonare și cea de supraviețuire se exprimă ca procent din nivelul martor.

Datele se evaluează prin metode statistice adecvate.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— linia celulară folosită, numărul de culturi celulare, metodele de menținere a culturilor celulare;

— condițiile experimentale: compoziția mediilor, concentrația de CO_2, concentrația substanței de testat, vehiculul folosit, temperatura de incubare, timpul de incubare, lungimea perioadei de expresie (după caz, raportul poate include numărul de celule cultivate și subculturile și schemele de alimentare), durata tratamentului, densitatea celulară pe parcursul tratamentului, tipul de sistem de activare metabolică la mamifere folosit, martorii pozitivi și negativi, tipul de agent selectiv folosit,

— argumentarea alegerii dozelor;

— metoda folosită pentru exprimarea numărului de celule viabile și mutante;

— evaluarea statistică;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare și interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

ALTERAREA ȘI REPARAREA ADN-ULUI – SINTEZA NEPROGRAMATĂ A ADN (UDS – *UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS*) – TEST *IN VITRO* PE CELULE DE MAMIFERE

1. METODĂ

1.1. Introducere

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. Definiție

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. Substanțe de referință

Nici una.

1.4. Principiul metodei de testare

Testul de sinteză neprogramată a ADN (UDS) măsoară sinteza de reparare a ADN-ului după excizia și eliminarea unui fragment de ADN care conține regiunea alterată de agenți chimici și fizici. Testul se bazează pe încorporarea timidinei marcate cu tritiu (timidină tritiată) (^{3}H-TdR) în ADN-ul celulelor de mamifere care nu sunt în faza S a ciclului celular. Încorporarea ^{3}H-TdR se poate determina prin autoradiografiere sau prin LSC (*liquid scintillation counting*) al ADN-ului din celulele tratate. Cu excepția cazului când se folosesc hepatocite primare de șobolan, culturile de celule de mamifere se tratează cu substanța de testat cu și fără un sistem exogen de activare metabolică. USD poate fi măsurată și prin metode *in vivo*.

1.5. Criterii de calitate

Nici unul.

1.6. Descrierea metodei de testare

Pregătire

Substanțele chimice de testat și substanțele martor sau substanțele de referință trebuie preparate în mediul de creștere ori dizolvate sau suspensionate într-un vehicul adecvat și ulterior diluate în mediul de cultură folosit în acest test. Concentrația finală a vehiculului nu trebuie să afecteze viabilitatea celulară.

În acest test pot fi folosite culturi celulare primare de hepatocite de șobolan, limfocite umane sau linii celulare bine caracterizate (de exemplu, fibroblaști diploizi umani).

Celulele trebuie tratate cu substanțele chimice de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem adecvat de activare metabolică.

Condiții experimentale

Numărul culturilor

Pentru fiecare metodă experimentală sunt necesare cel puțin două culturi celulare pentru autoradiografiere și șase culturi (sau mai puține, dacă există argumente științifice) pentru determinările prin LSC a UDS.

Utilizarea martorilor negativi și pozitivi

În fiecare experiment trebuie incluși simultan martori pozitivi și negativi (netratați și/sau vehicul) suplimentari, cu și fără activare metabolică.

În testele care folosesc hepatocite de șobolan, exemple de martori pozitivi sunt 7,12-dimetilbenzantracenul (7,12-DMBA) sau 2-acetilaminofluorenul (2-AAF). În cazul liniilor celulare bine caracterizate, 4-nitroquinolin-N oxid (4-NQO) este un exemplu de martor pozitiv care poate fi utilizat atât pentru autoradiografie, cât și pentru testele LSC efectuate fără activare metabolică; N-dimetilnitrozamina este un exemplu de compus care poate fi folosit ca martor pozitiv când se utilizează sisteme de activare metabolică.

Concentrații de expunere

Trebuie folosite mai multe concentrații ale substanței de testat, alese într-un interval adecvat pentru definirea răspunsului. Concentrația maximă trebuie să producă unele efecte citotoxice. Compușii relativ insolubili în apă trebuie testați până la limita superioară a solubilității. Pentru substanțele netoxice, ușor solubile în apă, limita superioară a concentrației se stabilește de la caz la caz.

Celule

Mediile de creștere, concentrația de CO_2, temperatura și umiditatea adecvate sunt necesare pentru menținerea culturilor. Liniile celulare bine caracterizate trebuie verificate periodic în vederea decelării contaminării cu *Mycoplasma*.

Activare metabolică

Pentru culturile primare de hepatocite nu se utilizează un sistem de activare metabolică. Liniile celulare bine caracterizate și limfocitele se tratează cu substanța de testat cu și fără un sistem adecvat de activare metabolică.

Mod de operare

Pregătirea culturilor

Liniile celulare bine caracterizate se obțin din culturi de sușe (prin tripsinizare sau descuamare) cultivate cu o densitate corespunzătoare în vase de cultură și incubate la 37 °C.

Culturile pe termen scurt de hepatocite de șobolan se obțin permițând hepatocitelor proaspăt disociate într-un mediu adecvat să se fixeze pe suprafața de creștere.

Culturile de limfocite umane sunt produse prin tehnici adecvate.

Tratarea culturilor cu substanța de testat

Hepatocite primare de șobolan

Hepatocitele de șobolan proaspăt izolate se tratează cu substanța de testat într-un mediu ce conține ^{3}H-TdR o perioadă de timp corespunzătoare. La sfârșitul perioadei de tratare, celulele trebuie filtrate, spălate, fixate și uscate. Lamele trebuie introduse în emulsia autoradiografică (alternativ, poate fi folosit un film fotografic), expuse, developate, colorate și numărate.

Liniile celulare bine caracterizate și limfocitele

Tehnica de autoradiografiere: Culturile celulare se tratează cu substanța de testat o perioadă de timp corespunzătoare, apoi se tratează cu ^{3}H-TdR. Perioadele se stabilesc în funcție de natura substanței, de activitatea sistemelor metabolizante și de tipul celulelor. Pentru determinarea maximului de USD, ^{3}H-TdR trebuie adăugată fie simultan cu substanța de testat, fie la câteva minute după expunerea la substanța de testat. Alegerea uneia dintre aceste metode se va face în funcție de interacțiunile posibile între substanța de testat și ^{3}H-TdR. Pentru a putea face distincția între USD și replicarea semiconservativă a ADN, aceasta din urmă poate fi inhibată, de exemplu, prin utilizarea unui mediu sărac în arginină, cu conținut scăzut în ser sau prin adăugare de hidroxiuree în mediul de cultură.

Măsurarea USD prin LSC: Înainte de începerea tratamentului cu substanța de testat, se blochează intrarea celulelor în faza S în modul descris mai sus. Ulterior, celulele se tratează cu substanța de testat în conformitate cu descrierea pentru autoradiografie. La sfârșitul perioadei de incubare, ADN este extras din celule și se determină conținutul total de ADN și proporția de ^{3}H-TdR încorporată.

Trebuie menționat faptul că dacă în tehnicile descrise mai sus se utilizează limfocite umane, nu este necesară suprimarea replicării semiconservative a ADN pe culturile nestimulate.

Analiză

Determinările autoradiografice

Pentru determinarea USD în celulele din cultură, nucleele de fază S nu se numără. Trebuie numărate minimum 50 celule per concentrație. Lamele trebuie etichetate înainte de numărare. De pe fiecare lamă se numără mai multe câmpuri distribuite aleatoriu, alese la distanță unul de celălalt. Cantitatea de ^{3}H-TdR încorporată în citoplasmă se determină prin numărarea a trei arii de mărimea nucleului, din citoplasma fiecărei celule numărate.

Determinările LSC

Pentru determinarea prin LSC a USD, se utilizează un număr adecvat de culturi pentru fiecare concentrație a substanței de testat și pentru martori.

Toate rezultatele trebuie confirmate într-un experiment independent.

2. **DATE**

Datele sunt prezentate sub formă de tabele.

2.1. **Determinările autoradiografice**

Cantitatea de ^{3}H-TdR încorporată în citoplasmă și numărul de granulații găsite în nucleii celulari trebuie să fie înregistrate separat.

Pentru descrierea distribuției cantității de ^{3}H-TdR încorporată în citoplasmă și numărul de granulații per nucleu se vor folosi media, mediana și modul șirului.

2.2. **Tehnica LSC**

În tehnica LSC, ^{3}H-TdR încorporată trebuie raportată folosind ca unitate de măsură dpm/µg ADN. Pentru descrierea distribuției încorporării se poate folosi media dpm/µg ADN cu deviația standard.

Datele se evaluează prin metode statistice adecvate.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— celulele folosite, densitatea și numărul de pasaje celulare în momentul tratamentului, numărul de culturi celulare;

— metodele folosite pentru menținerea culturilor, inclusiv compoziția mediului, temperatura și concentrația de CO_2;

— substanța de testat, vehiculul folosit, concentrațiile și argumentarea alegerii concentrațiilor folosite în experiment;

— informații despre sistemul de activare metabolică;

— schema de tratament;

— martorii pozitivi și negativi;

— tehnica de autoradiografie folosită;

— metodele folosite pentru a bloca intrarea celulelor în faza S;

— metodele folosite pentru extragerea ADN și determinarea conținutului total în ADN prin tehnica LSC;

— dacă este posibil, relația doză-efect;

— evaluarea statistică;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare și interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

TEST *IN VITRO* DE SCHIMBARE A CROMATIDELOR SURORI (SCE)

1. METODĂ

1.1. Introducere

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. Definiție

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. Substanțe de referință

Nici una.

1.4. Principiul metodei de testare

SCE este un test de scurtă durată de detectare a schimburilor reciproce de ADN între 2 cromatide surori ale unui cromozom în timpul duplicării. SCE reprezintă schimburile reciproce dintre produsele de replicare a ADN la loci aparent omologi. Se presupune că procesul de schimb implică ruperea și refacerea ADN-ului, însă datele existente despre bazele moleculare ale procesului sunt limitate. Detectarea SCE necesită câteva mijloace de marcare diferențiată a cromatidelor surori, rezultat ce poate fi obținut prin încorporarea bromodeoxiuridinei (BrdU) în ADN-ul cromozomial pentru două cicluri celulare.

Celulele de mamifere sunt tratate *in vitro* cu substanța de testat cu și fără un sistem exogen de activare metabolică la mamifere, după caz, apoi sunt cultivate pe o perioadă de două cicluri de replicare într-un mediu ce conține BrdU. După tratarea cu un inhibitor de fus mitotic (de exemplu colchicină) pentru oprirea celulelor în stadiul de metafază al mitozei (c-metafaza), celulele sunt prelevate și se efectuează preparatele cromozomiale.

1.5. Criterii de calitate

Nici unul.

1.6. Descrierea metodei de testare

Pregătire

— Pentru acest test se pot folosi culturi celulare primare (limfocite umane) sau linii celulare bine caracterizate (de exemplu, celule ovariene de hamster chinezesc). Liniile celulare trebuie verificate pentru a decela contaminarea cu *Mycoplasma*;

— Trebuie folosite medii de cultură și condiții de incubare (de exemplu temperatură, vase de cultură, concentrația de CO_2 și umiditate) corespunzătoare;

— Substanțele de testat pot fi preparate în mediul de cultură sau dizolvate sau suspensionate într-un vehicul adecvat înainte de începerea tratamentului celulelor. Concentrația finală de vehicul în mediul de cultură nu trebuie să afecteze în mod semnificativ viabilitatea celulară sau rata de creștere, iar efectele asupra frecvenței SCE trebuie monitorizate printr-un solvent martor;

— Celulele se tratează cu substanța de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem exogen adecvat de activare metabolică la mamifere. Alternativ, dacă se folosesc celule cu activitate metabolică intrinsecă, trebuie să se cunoască intensitatea și natura acestei activități, astfel încât să fie corespunzătoare clasei de substanțe chimice testate.

Condiții experimentale

Numărul de culturi

Pentru fiecare punct experimental se folosesc cel puțin două culturi.

Utilizarea martorilor pozitivi și negativi

În toate experimentele se includ martori pozitivi, utilizându-se atât un compus cu acțiune directă, cât și un compus ce necesită activare metabolică; de asemenea, se utilizează și un martor negativ pentru vehicul.

Exemple de substanțe ce pot fi folosite ca martori pozitivi:

— compuși cu acțiune directă:

  — etilmetansulfonatul;

— compuși cu acțiune indirectă:

  — ciclofosfamida.

După caz, se poate introduce un martor pozitiv suplimentar din aceeași clasă chimică cu substanța de testat.

Concentrații de expunere

Se folosesc cel puțin trei concentrații ale substanței de testat, spațiate în mod adecvat. Concentrația maximă trebuie să producă un efect toxic semnificativ, permițând totuși producerea unei replicări celulare corespunzătoare. Substanțele relativ insolubile în apă trebuie testate până la limita superioară a solubilității prin metode adecvate. Pentru substanțele netoxice ușor solubile în apă, limita superioară a concentrației substanței de testat se stabilește de la caz la caz.

Mod de operare

Pregătirea culturilor

Liniile celulare bine caracterizate se obțin din culturile de tulpini (de exemplu, prin tripsinizare sau prin descuamare), cultivate în vase de cultură cu o densitate corespunzătoare și incubate la 37 °C. Pentru culturile unistratificate, numărul de celule pe cultură trebuie ajustat astfel încât în momentul prelevării culturile să nu fie confluente în proporție mai mare de 50 %. Ca alternativă, se pot folosi suspensiile de culturi celulare. Culturile de limfocite umane se pot obține din sânge heparinizat, prin tehnici adecvate și sunt incubate la 37 °C.

Tratament

Celulele aflate în stadiul de creștere exponențială se tratează cu substanța de testat pe o perioadă de timp corespunzătoare, în majoritatea cazurilor fiind suficiente una sau două ore. Durata tratamentului poate fi extinsă în anumite cazuri până la două cicluri celulare complete. Celulele fără o activitate metabolică intrinsecă corespunzătoare se tratează cu substanța de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem de activare metabolică. La sfârșitul perioadei de expunere, celulele se spală abundent pentru îndepărtarea substanței de testat și se cultivă timp de două cicluri de replicare în prezența BrdU. Ca metodă alternativă, celulele pot fi tratate simultan cu substanța de testat și BrdU pentru întreaga perioadă de cultură de două cicluri celulare.

Culturile de limfocite umane trebuie tratate când sunt într-o stare semisincronă.

Celulele trebuie analizate în perioada celei de-a doua diviziuni după tratament, asigurând astfel expunerea la substanța chimică în cele mai sensibile stadii ale ciclului celular. Cu toate culturile la care s-a adăugat BrdU se va lucra la întuneric sau iluminare slabă de la o sursă incandescentă până în momentul prelevării celulelor, pentru reducerea la minim a fotolizei ADN-ului care conține BrdU.

Recoltarea celulelor

Culturile se tratează cu un inhibitor de fus mitotic (de exemplu colchicină) cu 1 – 4 ore înainte de recoltarea celulelor. Fiecare cultură este recoltată și prelucrată separat în vederea obținerii preparatelor cromozomiale.

Prepararea și colorarea cromozomilor

Preparatele cromozomiale se obțin prin tehnici citogenetice standard. Colorarea lamelor pentru evidențierea SCE se poate face prin mai multe tehnici (de exemplu, prin fluorescență plus metoda Giemsa).

Analiza

Numărul de celule analizate depinde de frecvența spontană a SCE la martori. De obicei, cel puțin 25 de metafaze bine exprimate pe cultură sunt analizate în termeni de SCE. Lamele trebuie etichetate înainte de analiză. La limfocitele umane se analizează numai celulele care conțin 46 de centromeri. Pe liniile celulare bine caracterizate se analizează numai metafazele care conțin ± 2 centromeri din numărul modal. Trebuie precizat dacă marcarea joncțiunii centromerice este sau nu inventariată ca SCE. Rezultatele trebuie confirmate într-un experiment independent.

2. **DATE**

Datele se sistematizează în tabele. Pentru fiecare cultură tratată sau martor se menționează separat numărul de SCE pentru fiecare metafază și numărul de SCE pe cromozom pentru fiecare metafază.

Datele se evaluează prin metode statistice adecvate.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— celulele folosite, metodele de menținere a culturilor celulare;

— condițiile de desfășurare a testului: compoziția mediului, concentrația de CO_2, concentrația substanței de testat, vehiculul folosit, temperatura de incubare, durata tratamentului, inhibitorul fusului de diviziune celulară folosit, concentrația acestuia și timpul de tratament cu acesta, tipul de sistem folosit pentru activarea metabolică la mamifere, martorii pozitivi și negativi;

— numărul de culturi la fiecare punct experimental;

— detalii despre tehnica folosită pentru prepararea lamelor;

— numărul de metafaze analizate (datele vor fi redate separat pentru fiecare cultură în parte);

— numărul mediu de SCE per celulă și per cromozom (datele trebuie indicate separat pentru fiecare cultură în parte);

— criteriile pentru numărarea SCE;

— argumentarea alegerii dozelor;

— relația doză-răspuns, dacă este posibil;

— evaluarea statistică;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare și interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

TEST DE LETALITATE RECESIVĂ ÎN RAPORT CU SEXUL LA *DROSOPHILA MELANOGASTER* (SLRL)

1. METODĂ

1.1. Introducere

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. Definiție

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. Substanțe de referință

Nici una.

1.4. Principiul metodei de testare

Testul SLRL pe *Drosophila melanogaster* este un test care depistează incidența mutațiilor, atât a mutațiilor punctiforme, cât și a delețiilor mici, în liniile germinale ale insectelor. Acest test este un test de mutație directă prin care pot decela mutațiile în aproximativ 800 loci de pe cromozomul X, ceea ce reprezintă aproximativ 80 % din totalul de loci ai acestuia. Cromozomul X reprezintă aproximativ o cincime din întregul genom haploid.

Mutațiile cromozomului X la *Drosophila melanogaster* se exprimă fenotipic la masculi purtători ai genei mutante. Dacă mutația este letală în condiții de hemizigotism, prezența sa se deduce din absența unei generații de descendenți de sex masculin, din cele două care sunt normal produse de o femelă heterozigotă. Aceste determinări se fac prin intermediul unor cromozomi special marcați și dispuși.

1.5. Criterii de calitate

Nici unul.

1.6. Descrierea metodei de testare

Pregătire

Tulpini

Pot fi folosiți masculi dintr-o tulpină de tip sălbatic bine caracterizată și femele care conțin cromozomul Muller-5. De asemenea, se pot folosi femele din alte tulpini marcate corespunzător cu cromozomi X cu inversiuni multiple.

Substanța de testat

Substanțele trebuie dizolvate în apă. Substanțele insolubile în apă pot fi dizolvate sau suspensionate într-un vehicul adecvat (de exemplu, un amestec de etanol și Tween-60 sau 80), apoi diluate cu apă sau soluție salină înainte de administrare. Se recomandă evitarea folosirii ca vehicul a dimetilsulfoxidului (DMSO).

Număr de animale

Sensibilitatea și puterea testului sunt predeterminate. Frecvența mutanților spontani observați la martorul corespunzător influențează puternic numărul de cromozomi tratați care trebuie analizați.

Calea de administrare

Expunerea se poate face pe cale orală, prin injectare sau expunere la gaze sau vapori. Administrarea substanței de testat prin hrană se poate face în soluții zaharoase. Dacă este necesar, substanța poate fi dizolvată într-o soluție de NaCl 0,7 % și injectată în torace sau abdomen.

Folosirea martorilor pozitivi și negativi

În fiecare experiment trebuie folosiți martori negativi (pentru vehicul) și pozitivi. Cu toate acestea, dacă sunt disponibile date istorice pertinente despre martori, nu este necesară folosirea simultană a acestora.

Niveluri de expunere

Se folosesc trei niveluri de expunere. Pentru o evaluare preliminară se poate folosi un singur nivel de expunere, acesta fiind fie concentrația maximă tolerată, fie nivelul de concentrație care produce câteva semne de toxicitate. Pentru substanțele netoxice se face expunerea la concentrația maximă care poate fi obținută practic.

Mod de operare

Masculii din tulpinile sălbatice (în vârstă de trei-cinci zile) se tratează cu substanța de testat, apoi sunt împerecheați individual cu un număr în exces de femele virgine din tulpina Muller-S sau dintr-o altă tulpină marcată corespunzător (cu multiple inversiuni ale cromozomilor X). La fiecare două – trei zile femelele trebuie înlocuite cu alte femele virgine pentru a acoperi întregul ciclu al celulelor germinale. Descendenții acestor femele trebuie inventariați pentru depistarea efectelor letale corespunzătoare efectelor asupra spermatozoizilor maturi, spermatidelor în stadiu intermediar și tardiv, spermatidelor în stadiu timpuriu, spermatocitelor și spermatogoniilor din timpul tratamentului.

Femelele F_1 heterozigote din împerecherea de mai sus vor fi împerecheate individual (de exemplu, o femelă per fiolă) cu frații lor. În generația F_2 fiecare cultură este inventariată pentru a depista absența masculilor din tulpinile sălbatice. Dacă o cultură provine dintr-o femelă F_1 purtătoare de genă letală în cromozomul X parental (de exemplu, nu se observă masculi cu cromozomul tratat), fiicele acestei femele cu același genotip trebuie testate pentru a se constata dacă gena letală se repetă în generația următoare.

2. **DATE**

Datele se sistematizează în tabele în care se specifică numărul de cromozomi X testați, numărul de masculi nefertili și numărul de cromozomi letali la fiecare concentrație de expunere și pentru fiecare perioadă de împerechere, pentru fiecare mascul tratat. Trebuie raportat numărul de clustere de diferite dimensiuni per mascul. Aceste rezultate trebuie confirmate într-un experiment separat.

Pentru evaluarea SLRL se vor folosi metode statistice adecvate. Trebuie luată în considerare aglomerarea de gene letale recesive provenite de la un singur mascul, care trebuie evaluată cu metode statistice corespunzătoare.

3. **RAPORT**

3.1. **de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— tulpina: tulpinile sau liniile de *Drosophila* folosite, vârsta insectelor, numărul de masculi tratați, numărul de masculi sterili, numărul de culturi F_2 obținute, numărul de culturi F_2 fără descendenți, numărul de cromozomi purtători de genă dominantă letală detectați în fiecare stadiu al celulei germinale;

— criteriile de stabilire a dimensiunilor lotului tratat;

— condițiile experimentale: descrierea detaliată a tratamentului și schema prelevării probelor, nivelul de expunere, date de toxicitate, martori negativi (solvent) și pozitivi, după caz;

— criteriile pentru numărarea mutațiilor letale;

— dacă este posibil, relația expunere/efect;

— evaluarea statistică;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare şi interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

TEST *IN VITRO* DE TRANSFORMARE A CELULELOR DE MAMIFERE

1. METODĂ

1.1. Introducere

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. Definiție

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. Substanțe de referință

Nici una.

1.4. Principiul metodei de testare

Pentru determinarea modificărilor fenotipice *in vitro* induse de substanțele chimice asociate cu transformări maligne *in vivo*, se folosesc sisteme de cultură de celule de mamifere. Cel mai des utilizate celule sunt C3H10T½, 3T3, SHE și celule de la șobolani Fisher. Testele urmăresc modificările în morfologia celulară, formarea de focare sau modificări în dependența de ancorare pe agar-agar semisolid. Există sisteme folosite mai rar care depistează alte modificări celulare morfologice sau fiziologice în urma expunerii la substanțe chimice cancerigene. Nici unul din mecanismele testate *in vitro* nu are o legătură mecanică determinată cu cancerul. Anumite sisteme de testare pot detecta promotori tumorali. Citotoxicitatea poate fi determinată prin măsurarea efectelor materialului testat asupra capacităților de formare de colonii (eficiența de clonare) sau asupra ratei de creștere a culturilor. Măsurarea citotoxicității are rolul de a stabili dacă expunerea la substanța chimică testată are relevanță toxicologică, dar nu poate fi folosită pentru a calcula frecvența transformărilor în toate testele, deoarece unele dintre acestea pot necesita incubare prelungită și/sau reînsămânțare.

1.5. Criterii de calitate

Nici unul.

1.6. Descrierea metodei de testare

Pregătire

Celule

În funcție de testul de transformare folosit, sunt disponibile diferite linii celulare sau celule primare. Cercetătorul trebuie să se asigure că celulele folosite în cadrul testului manifestă modificări fenotipice corespunzătoare după expunerea la un agent cancerigen cunoscut și că testul efectuat are o validitate și o fiabilitate demonstrate și documentate.

Mediu

Se utilizează medii și condiții experimentale corespunzătoare testului de transformare efectuat.

Substanța de testat

Substanțele testate pot fi preparate în mediile de cultură sau dizolvate ori suspensionate într-un vehicul adecvat, înainte de tratarea celulelor. Concentrația finală a vehiculului în sistem nu trebuie să afecteze viabilitatea celulară, rata de creștere sau incidența transformărilor.

Activarea metabolică

Celulele sunt expuse la substanța de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem adecvat de activare metabolică. Dacă se utilizează un tip de celule cu activitate metabolică intrinsecă, natura acestei activități va fi recunoscută ca fiind adecvată clasei de substanțe chimice testate.

Condiții experimentale

Utilizarea martorilor pozitivi și negativi

În fiecare experiment se includ martori pozitivi, utilizându-se atât un compus cu acțiune directă, cât și un compus ce necesită activare metabolică; de asemenea, se utilizează și un martor negativ (pentru vehicul).

Printre exemplele de substanțe ce pot fi folosite ca martor pozitiv se numără:

— compuși cu acțiune directă:

  — etilmetansulfonatul;

  — β-propiolactona;

— compuși care necesită activare metabolică:

  — 2-acetilaminofluoren;

  — 4-dimetilaminoazobenzen;

  — 7,12-dimetilbenzantracen.

Dacă este necesar, poate fi inclus un martor pozitiv suplimentar care să aparțină aceleiași clase de substanțe ca și substanța de testat.

Concentrații de expunere

Se folosesc mai multe concentrații ale substanței de testat. Acestea trebuie să prezinte efect toxic în funcție de concentrație, concentrația maximă determinând un nivel scăzut de supraviețuire, iar supraviețuirea la concentrația minimă fiind aproximativ aceeași cu cea de la martorul negativ. Pentru substanțele relativ insolubile în apă trebuie testată limita superioară a solubilității, folosind procedee corespunzătoare. Pentru substanțele netoxice, foarte ușor solubile în apă, limita superioară a concentrației se stabilește de la caz la caz.

Mod de operare

Celulele se tratează o perioadă corespunzătoare, în funcție de sistemul de testare utilizat, acest lucru putând presupune reevaluarea dozei prin schimbarea mediului (și, după caz, un amestec de activare metabolică proaspăt) dacă expunerea este prelungită. Celulele fără o activitate metabolică intrinsecă suficientă sunt expuse la substanța de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem adecvat de activare metabolică. La sfârșitul perioadei de expunere, celulele trebuie spălate, îndepărtând substanța de testat, și cultivate în condiții adecvate pentru apariția modificărilor fenotipice urmărite și pentru stabilirea incidenței de transformare. Toate rezultatele trebuie confirmate în cadrul unui experiment independent.

2. **DATE**

Datele se sistematizează în tabele și pot avea diferite forme în funcție de metoda folosită, ca, de exemplu, numărarea plăcilor, plăci pozitive sau număr de celule transformate. După caz, supraviețuirea se exprimă ca procent din nivelul de supraviețuire la probele martor, iar frecvența de transformare ca raport între numărul de celule transformate și numărul de celule supraviețuitoare. Datele se evaluează prin metode statistice corespunzătoare.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— tipul de celule folosite, numărul de culturi celulare, metoda de menținere a culturilor;

— condițiile experimentale: concentrația substanței de testat, vehiculul folosit, timpul de incubare, durata și frecvența tratamentului, densitatea celulară pe parcursul tratamentului, tipul de sistem exogen folosit pentru activarea metabolismului, martorii pozitivi și negativi, caracteristicile fenotipului monitorizat, tipul de sistem selectiv folosit (după caz), argumentarea alegerii dozelor;

— metoda folosită pentru exprimarea numărului de celule viabile și transformate;

— evaluarea statistică;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare și interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

TEST DE LETALITATE DOMINANTĂ LA ROZĂTOARE

1. METODĂ

1.1. Introducere

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. Definiție

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. Substanțe de referință

Nici una.

1.4. Principiul metodei de testare

Efectele letalității dominante determină moartea embrionului sau a fetusului. Inducerea genelor letalității dominante prin expunere la o substanță chimică indică faptul că acea substanță a acționat la nivelul țesutului germinal al speciei testate. Este cunoscut faptul că letalitatea dominantă se datorează unei anomalii cromozomiale (numerice și structurale). Moartea embrionului, în cazul în care femelele sunt tratate se poate datora și efectelor toxice.

În general, masculii se tratează cu substanța de testat și se împerechează cu femele virgine netratate. Pot fi studiate separat diferitele stadii ale celulelor germinale, la intervale de împerechere succesive. Creșterea numărului de ovule fecundate moarte per femelă în lotul tratat comparativ cu femelele din lotul martor reflectă posibilitatea pierderii sarcinii după implantare. Pierderile înaintea ovoimplantației pot fi estimate luând în considerare numărul de *corpora lutea* sau comparând numărul total de implanturi per femelă în lotul tratat și în lotul martor. Efectul total de letalitate dominantă reprezintă suma pierderilor înainte și după implantare. Calcularea efectului total al letalității dominante se bazează pe comparația dintre implanturile viabile la femelele din lotul tratat și la cele din lotul martor. Reducerea numărului de implanturi la anumite intervale de timp poate fi rezultatul distrugerii celulelor (a spermatocitului și/sau a spermatogoniei).

1.5. Criterii calitative

Nici unul.

1.6. Descrierea metodei de testare

Pregătire

Dacă este posibil, substanțele folosite se dizolvă sau se suspensionează într-o soluție izotonică salină. Substanțele chimice insolubile în apă pot fi dizolvate sau suspensionate în vehicule corespunzătoare. Vehiculul folosit nu trebuie să interfereze cu substanța chimică de testat și nici nu trebuie să producă efecte toxice. Pentru testarea chimică, se folosesc substanțe chimice de testat proaspete.

Condiții experimentale

Calea de administrare

De regulă, compusul de testat trebuie administrat o singură dată. În funcție de informațiile toxicologice, se poate utiliza o schemă de tratament repetat. Căile normale de administrare sunt: intubarea orală sau injectarea intraperitoneală. Se pot folosi și alte căi de administrare corespunzătoare.

Animale de experiență

Se recomandă utilizarea șobolanilor sau a șoarecilor. Animalele sănătoase și mature din punct de vedere sexual se repartizează aleatoriu în loturile tratate și în loturile martor.

Numărul și sexul animalelor

Se utilizează un număr corespunzător de masculi tratați, luând în considerare variația spontană a caracterelor biologice evaluate. Numărul se stabilește în funcție de sensibilitatea detectării și de gradul de încredere care au fost predeterminate. De exemplu, în cadrul unui test tipic, numărul masculilor din fiecare lot tratat trebuie să fie suficient pentru a asigura între 30 - 50 de femele gestante în fiecare perioadă de împerechere.

Utilizarea martorilor negativi și pozitivi

În general, în fiecare experiment se utilizează simultan martori pozitivi și negativi. Când experimente efectuate recent în același laborator oferă rezultate acceptabile cu privire la martorii pozitivi, aceste rezultate pot fi folosite ca martori pozitivi în experimentul curent. Substanțele martor pozitiv trebuie folosite la o doză scăzută corespunzătoare (de ex. MMS, intraperitoneal într-o doză de 10 mg/kg) pentru a demonstra sensibilitatea testului.

Doze

În mod normal, se utilizează trei doze de tratament. Doza mare trebuie să producă efecte toxice sau să reducă fertilitatea animalelor tratate. În anumite cazuri, este suficientă folosirea unei singure doze mari.

Test limită

Substanțele care nu sunt toxice se testează la doza de 5 g/kg în cazul unei singure administrări sau 1 g/kg/zi în cazul administrărilor repetate.

Mod de operare

Sunt disponibile mai multe scheme de tratament. Cea mai frecventă este aceea a administrării unice a substanței de testat. Pot fi folosite și alte scheme de tratament.

Fiecare mascul se împerechează pe rând cu una sau două femele virgine netratate, la intervale corespunzătoare după tratament. Femelele sunt lăsate împreună cu masculii pe durata ciclului estral sau până la confirmarea împerecherii (prezența spermei în vagin sau a dopului vaginal).

Numărul împerecherilor după tratament se stabilește în funcție de schema de tratament și trebuie să asigure prelevarea de celule germinale în toate stadiile de dezvoltare a acestora.

Femelele sunt sacrificate în cea de-a doua jumătate a gestației, iar conținutul uterului se examinează în vederea decelării numărului de implanturi viabile și a numărului de implanturi neviabile. Ovarele se examinează pentru stabilirea numărului de *corpora lutea*.

2. **DATE**

Datele se sistematizează în tabele și prezintă numărul masculilor, al femelelor gestante și cel al femelelor negestante. Rezultatele fiecărei împerecheri, inclusiv identitatea fiecărui mascul și a fiecărei femele se înregistrează individual. În cazul fiecărei femele se menționează săptămâna de împerechere, doza administrată masculilor și numărul implanturilor vii și moarte.

Calcularea efectului total de letalitate dominantă se bazează pe comparația dintre implanturile vii, pentru fiecare femelă din cadrul lotului tratat și a implanturilor vii pentru fiecare femelă din cadrul lotului martor. Raportul dintre numărul implanturilor vii și moarte în lotul tratat se compară cu raportul din lotul martor și este analizat pentru a evidenția moartea produsului de concepție în faza post-implantare.

Dacă datele sunt înregistrate ca mortalitate precoce și mortalitate tardivă, din tabele trebuie să rezulte clar acest lucru. De asemenea, trebuie înregistrate pierderile în faza de preimplantare. Pierderile în faza de preimplantare se pot calcula în funcție de diferența dintre numărul de *corpora lutea*și numărul implanturilor sau urmărind reducerea numărului mediu de implanturi per uter la lotul tratat în comparație cu împerecherile martor.

Datele se evaluează prin metode statistice adecvate.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— specia, linia, vârsta și greutatea animalelor, numărul animalelor pe sexe folosite atât în lotul tratat, cât și în lotul martor;

— substanța de testat, vehiculul, dozele testate și argumentarea selectării dozelor, substanțe folosite ca martor negativ și pozitiv, datele cu privire la toxicitate;

— calea de administrare și schema de tratament;

— schema de împerechere;

— metoda folosită pentru confirmarea împerecherii;

— momentul sacrificării;

— criteriul de inventariere a efectelor de letalitate dominantă;

— relația doză/răspuns, după caz;

— evaluarea statistică a rezultatelor;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare și interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

STUDIU CITOGENETIC *IN VIVO* AL CELULELOR GERMINALE DE MAMIFERE

1. METODĂ

1.1. Introducere

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. Definiție

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. Substanțe de referință

Nici una.

1.4. Principiul metodei de testare

Acest studiu citogenetic *in vivo* decelează aberațiile cromozomiale structurale în spermatogonii. Studiul constă în decelarea aberațiilor de tip cromatidian și cromozomial prin analiza mitozei spermatogoniilor.

Metoda utilizează preparate din testicule de mamifere expuse la substanțele chimice de testat administrate pe căi specifice și sacrificate la diferite intervale de timp. Animalele sunt tratate în continuare, înainte de sacrificare, cu inhibitori ai fusului mitotic cum ar fi colchicina pentru a acumula celulele într-o fază de tip metafază a mitozei (c-metafază). Se realizează preparate cromozomiale pornind de la celule uscate în aer și apoi colorate, care se examinează microscopic.

Analiza spermatocitelor în diachineză-metafază I pentru translocarea multivalentă a spermatogoniei după tratament permite obținerea unor informații suplimentare utile.

1.5. Criterii de calitate

Nici unul.

1.6. Descrierea metodei de testare

Pregătire

Substanțele chimice de testat se dizolvă în soluție izotonică salină. Dacă sunt insolubile, acestea se dizolvă sau se suspensionează în vehicule corespunzătoare. Se utilizează soluții proaspăt preparate. Vehiculul folosit pentru realizarea soluției nu trebuie să interfereze cu substanța de testat și nu trebuie să producă efecte toxice.

Calea de administrare

Compusul de testat se administrează, în general, o singură dată. În funcție de informațiile toxicologice se poate folosi o schemă de tratament repetat. Cu toate acestea, tratamentul repetat poate fi aplicat numai în cazul în care substanța de testat nu prezintă efecte citotoxice majore în procesul de diferențiere a spermatogoniei.

Calea obișnuită de administrare este cea orală sau prin injectare intraperitoneală. Se pot folosi și alte căi de administrare.

Animale de experiență

Cel mai des se folosesc șoareci și hamsteri chinezești, dar pot fi folosite și alte specii de mamifere.

Se folosesc masculi maturi din punct de vedere sexual, care sunt repartizați aleatoriu în loturile tratate și martor.

Numărul animalelor

Se folosesc cel puțin 5 masculi per lot.

Utilizarea martorilor negativi și pozitivi

În toate experimentele se folosesc simultan martori pozitivi și negativi.

Substanțele martor pozitiv se folosesc într-o doză mică adecvată (ex. mitomicină C intraperitoneal, până la 0,3 mg/kg) pentru a demonstra sensibilitatea testului.

Doze

Se folosește o doză de compus de testat, și anume doza maximă tolerată sau cea care produce unele efecte citotoxice. Dacă această doză induce moartea unui număr mare de celule, se folosește o altă doză, mai slabă, care să producă citotoxicitate. În cazul în care este necesar să se stabilească relația doză-răspuns, este nevoie de cel puțin trei doze (de ex. pentru a confirma un răspuns pozitiv slab). Substanțele netoxice se testează în doza maximă folosită, atât pentru administrare repetată, cât și pentru administrare unică.

Mod de operare

În general, compusul de testat se administrează într-o singură doză. După tratament, din lotul tratat cu doza maximă se prelevează trei probe la intervale diferite de timp. Prelevarea centrală are loc după 24 de ore. Deoarece cinetica ciclului celular poate fi influențată de compusul de testat, prima și ultima prelevare au loc, la intervale corespunzătoare, în termen de 6 până la 48 de ore de la administrarea compusului. Pentru doze suplimentare, probele trebuie prelevate în intervalul cel mai sensibil sau, dacă acestea nu este cunoscut, 24 de ore după tratament.

Alternativ, poate fi folosită o schemă de tratament repetat, animalele fiind sacrificate la 24 de ore de la ultima administrare. Pot fi prelevate probe suplimentare într-un interval de 6 - 24 ore.

Pregătirea testiculelor

Pentru analiza mitozelor spermatogoniilor, animalele se injectează intraperitoneal cu o doză adecvată de inhibitor al fusului mitotic (ex. colchicina). Apoi animalele sunt sacrificate la intervale de timp adecvate: pentru șoareci, intervalul variază între trei și cinci ore, în timp ce pentru hamsterii chinezești pot fi necesare mai mult de cinci ore.

Se folosește tehnica de uscare la aer. Metoda standard poate fi modificată în funcție de specia folosită. Se obțin suspensii de celule, se tratează cu soluție hipotonică și se fixează. Celulele se așază pe lame și se colorează. Lamele numerotate sunt codate înainte de a fi analizate microscopic.

Analiză

În vederea decelării aberațiilor cromozomiale structurale, se analizează cel puțin 100 de metafaze mitotice, bine etalate, având numărul complet de centromeri. De asemenea, pentru a se evidenția un eventual efect citotoxic, se stabilește raportul mitozelor spermatogoniilor față de prima și a doua metafază meiotică, ce se poate determina pe un număr total de 100 celule în diviziune per animal.

2. **DATE**

Datele se sistematizează în tabele. Toate tipurile de aberații sunt inventariate separat pentru fiecare animal tratat și martor. Se includ numărul total de celule analizate și numărul total de celule cu aberații pentru fiecare lot. Se calculează deviația standard și mediile tuturor parametrilor. Dacă este determinat, raportul mediu al mitozelor spermatogoniilor față de prima și a doua metafază meiotică este trecut în tabel pentru fiecare lot tratat și lot martor.

Datele se evaluează prin metode statistice corespunzătoare.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— specia și linia de descendență a masculilor, vârsta și greutatea masculilor;

— numărul animalelor folosite atât în lotul tratat, cât și în lotul martor;

— condițiile experimentale: descrierea detaliată a tratamentului, dozele folosite, vehiculul, inhibitorul de fus mitotic utilizat;

— numărul celulelor analizate pentru fiecare animal din fiecare lot;

— separat pentru fiecare animal tratat și martor: tipurile și numărul aberațiilor;

— evaluarea statistică a rezultatelor;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare şi interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

TESTUL PETEI (*SPOT TEST*) LA ȘOARECE

1. METODĂ

1.1. Introducere

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. Definiție

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. Substanțe de referință

Nici una.

1.4. Principiul metodei de testare

Acesta este un test *in vivo* pe șoareci, în care embrionii aflați în dezvoltare sunt expuși la substanțele chimice de testat. Celulele țintă sunt melanoblastele, iar genele de interes sunt cele care controlează pigmentarea blănii. Embrionii aflați în dezvoltare sunt heterozigoți pentru un număr dintre aceste gene care determină culoarea blănii. În cursul unor evenimente genetice, o mutație sau o pierdere a alelelor dominante ale acestor gene dintr-o melanoblastă determină exprimarea fenotipului recesiv la celulele descendenților, acest fapt manifestându-se prin apariția unei pete de culoare pe suprafața blănii la puii de șoareci. Se evaluează numărul descendenților cu aceste pete (mutații), iar frecvența acestora se compară cu aceea observată la descendenții proveniți din embrionii tratați doar cu solvent. Testul petei decelează apariția presupuselor mutații somatice ce survin în celulele fetale.

1.5. Criterii de calitate

Nici unul.

1.6. Descrierea metodei

Pregătire

Dacă este posibil, substanțele de testat se dizolvă sau se suspensionează în soluție izotonică salină. Substanțele chimice insolubile în apă sunt dizolvate sau suspensionate în vehicule corespunzătoare. Vehiculul nu trebuie să interfereze cu substanța de testat și nu trebuie să producă efecte toxice. Se utilizează soluții proaspăt preparate.

Animalele de experiență

Se împerechează șoareci din linia T (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, $c^{ch}p/c^{ch}p$; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting; s/s) fie cu linia HT (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe), fie cu linia C57 BL (nonagouti, a/a). Se mai pot folosi alte împerecheri corespunzătoare, cum ar fi între NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) și DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute, d/d) pentru a produce descendenți nonagouti.

Număr și sex

Se tratează un număr suficient de femele gestante pentru a produce un număr corespunzător de descendenți pentru fiecare doză de tratament. Mărimea corespunzătoare a eșantionului este dată de numărul petelor observate la șoarecii tratați în comparație cu datele obținute la lotul martor. Rezultatele negative se acceptă numai după ce s-au inventariat cel puțin 300 de descendenți de la femelele tratate cu doza maximă.

Utilizarea martorilor negativi și pozitivi

Este necesar să fie disponibile date martor simultane obținute de la șoarecii tratați numai cu vehicul (martor negativ). Pentru a mări sensibilitatea testului, pot fi puse laolaltă și date martor istorice de la același laborator, cu condiția să fie omogene. În cazul în care nu se detectează nici un efect mutagen al substanței de testat, pot fi folosite ca martor pozitiv rezultatele recente obținute în același laborator pe loturi tratate cu o substanță cu cunoscută ca fiind mutagenă.

Calea de administrare

Calea obișnuită de administrare a substanței la femelele gestante este intubarea orală sau injectarea intraperitoneală. Pot fi utilizate, după caz, și alte căi de administrare.

Doze

Se folosesc cel puțin două doze, inclusiv o doză care să determine apariția semnelor de toxicitate sau reducerea numărului de pui la o fătare. Pentru substanțele netoxice trebuie folosită doza maximă care poate fi administrată.

Mod de operare

În mod normal, se administrează un tratament unic, în ziua a opta, a noua sau a zecea de gestație, considerând ziua 1 ziua în care se observă pentru prima dată dopul vaginal. Aceste zile corespund zilelor 7,25, 8,25 și 9,25 de la concepție. Tratamente succesive se pot efectua în zilele menționate.

Analiză

În intervalul cuprins între trei și patru săptămâni de la fătare, descendenții se codează și se examinează pentru observarea eventualelor pete apărute. Se disting trei categorii de pete:

(a) pete albe de până la 5 mm pe linia medio-ventrală, despre care se presupune că apar prin moarte celulară (WMVS);

(b) pete galbene, de tip agouti, dispuse în regiunile mamare, genitale, axilare și inghinale, pe gât, precum și în mijlocul frunții, despre care se presupune că apar ca urmare a procesului de nediferențiere (MDS);

(c) pete pigmentare și pete albe distribuite aleatoriu pe piele, despre care se presupune că provin din mutațiile somatice (RS).

Toate cele trei clase sunt descrise și înregistrate, dar numai ultima, RS, prezintă relevanță din punct de vedere genetic. Problemele pe care le ridică distincția între MDS și RS pot fi rezolvate prin examinarea probelor de blană prin microscopie cu fluorescență.

Se înregistrează anomaliile morfologice genetice macroscopice apărute la descendenți.

2. **DATE**

Datele sunt prezentate ca număr total al descendenților inventariați și numărul celor care au una sau mai multe pete produse prin mutații somatice. Datele din loturile tratate și loturile martor negativ se compară printr-o metodă corespunzătoare. De asemenea, datele sunt prezentate în raport cu seria de pui de la o fătare.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— liniile folosite la încrucișare;

— numărul femelelor gestante din loturile tratate și loturile martor;

— mărimea medie a seriei de pui din loturile tratate și loturile martor, la naștere și la înțărcare;

— dozele de substanță de testat;

— solventul utilizat;

— ziua gestației în care s-a efectuat tratamentul;

— calea de administrare;

— numărul total de descendenți examinați și numărul celor care prezintă WMVS, MDS și RS din loturile tratate și loturile martor;

— anomalii morfologice macroscopice;

— relația doză-răspuns la RS dacă este posibil;

— evaluarea statistică;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare și interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

TRANSLOCAȚII EREDITARE LA ȘOARECI

1. METODĂ

1.1. Introducere

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.2. Definiție

A se vedea introducerea generală, partea B.

1.3. Substanțe de referință

Nici una.

1.4. Principiul metodei de testare

Testul translocației ereditare la șoareci decelează modificările cromozomiale structurale și numerice ale celulelor germinale de mamifere, apărute la descendenții din prima generație. Tipurile de modificări cromozomiale detectate sunt translocații reciproce și, dacă în experiment sunt incluși și descendenții femele din generația F_1, pierderea cromozomului X. Purtătorii de translocații și femelele XO prezintă fertilitate redusă care este folosită la selecția descendenților F_1 pentru efectuarea analizelor citogenetice. Sterilitatea completă este determinată de anumite tipuri de translocații (X-autozom și tipul c-t). Translocațiile se observă citogenetic în celulele meiotice în diachineză-metafaza I la masculi, fie că sunt masculi F_1, fie descendenți masculi ai femelelor F_1. Femelele XO sunt identificate citogenetic prin prezența a doar 39 de cromozomi în mitozele măduvei osoase.

1.5. Criterii de calitate

Nici unul.

1.6. Descrierea testului

Pregătire

Substanțele chimice de testat se dizolvă în soluție izotonică salină. Dacă sunt insolubile în apă, se dizolvă sau se suspensionează într-un vehicul corespunzător. Se utilizează soluții proaspăt preparate ale compusului de testat. Vehiculul nu trebuie să interfereze cu compusul de testat și nu trebuie să producă efecte toxice.

Calea de administrare

Calea de administrare obișnuită este intubarea orală sau injectarea intraperitoneală. Se pot folosi și alte căi de administrare.

Animale de experiență

Pentru a facilita reproducerea și verificarea citologică, aceste experimente se fac pe șoareci. Nu este necesară utilizarea anumitor linii de șoareci. Cu toate acestea, mărimea medie a seriei de pui din linia respectivă trebuie să fie în medie mai mare de opt și să fie relativ constantă. Se folosesc animale mature din punct de vedere sexual.

Numărul animalelor

Numărul de animale necesare depinde de frecvența apariției translocațiilor spontane și de rata minimă de inducție necesară pentru un rezultat pozitiv.

De obicei, testul se efectuează pe descendenții masculi F_1. Trebuie testați cel puțin 500 de descendenți masculi F_1 pe lot. Dacă experimentul include și descendenți femele F_1, sunt necesari 300 de masculi și 300 de femele.

Utilizarea martorilor negativi și pozitivi

Este necesar să fie disponibile date martor adecvate obținute din martori simultani și din martori istorici. Atunci când sunt disponibile rezultate acceptabile de la martorul pozitiv din alte experimente desfășurate recent în același laborator, acestea pot fi folosite în locul unui martor pozitiv simultan.

Doze

Se testează o singură doză, de obicei doza maximă asociată cu producerea efectelor toxice minime, dar care nu produce efecte asupra comportamentului de reproducere sau asupra supraviețuirii. Pentru stabilirea unei relații doză/răspuns sunt necesare încă două doze mai mici. În cazul expunerii la substanțe chimice netoxice, este necesar să se administreze doza maximă posibilă.

Mod de operare

Tratament și împerechere

Există două scheme de tratament. Administrarea în doză unică este cel mai des utilizată; se poate recurge și la administrarea substanței de testat șapte zile pe săptămână timp de 35 de zile. Numărul de împerecheri după efectuarea tratamentului depinde de schema de tratament și trebuie să asigure prelevarea de celule germinale tratate în toate stadiile. La sfârșitul perioadei de împerechere, femelele sunt plasate în cuști individuale. Când gestantele fată, se înregistrează data, mărimea seriei de pui și sexul descendenților. Toți puii masculi sunt înțărcați, iar femelele pui sunt eliminate, cu excepția cazului în care sunt incluse și ele în experiment.

Testarea heterozigoților de translocație

Se utilizează una din cele două metode posibile:

— testarea, prin analize citogenetice, a fertilității descendenței F_1 și verificarea ulterioară a eventualilor purtători de translocații prin analiză citogenetică;

— analiza citogenetică a tuturor descendenților masculi F_1 fără o selecție prealabilă prin testarea fertilității.

(a) Testarea fertilității

Fertilitatea redusă a unui descendent F_1 poate fi stabilită prin observații asupra mărimii seriei de pui și/sau prin analizarea conținutului uterin la femelele gestante.

Este necesar să se stabilească criteriile de determinare a fertilități normale sau reduse la linia de șoareci folosită.

Observații asupra mărimii seriei de pui: Masculii F_1 care urmează să fie testați sunt plasați în cuști individuale cu femele din același experiment sau din colonie. Cuștile se verifică zilnic începând cu a optsprezecea zi de la împerechere. La fătare se înregistrează mărimea seriei de pui și sexul descendenței F_2, după care puii sunt eliminați. Dacă se testează descendența feminină F_1, descendenții F_2 proveniți din serii mici de pui sunt păstrați pentru testări suplimentare. Toate femelele purtătoare de translocații sunt verificate prin analiza citogenetică a unei translocații la oricare din descendenții lor masculi. Femelele XO se recunosc prin schimbarea raportului între sexe masculi/femele la descendenții lor, de la 1:1 la 1:2. Într-o metodă secvențială, animalele F_1 normale nu fac obiectul unei alte verificări dacă prima serie de pui F_2 atinge sau depășește o valoare normală predeterminată, în caz contrar observându-se o a doua sau o a treia serie de pui F_2.

Animalele F_1 care nu pot fi clasificate ca normale după observațiile efectuate pe cel mult trei serii de pui F_2, sunt testate prin analiza conținutului uterin al femelelor gestante sau sunt supuse direct analizei citogenetice.

Analiza conținutului uterin: Reducerea mărimii seriei de pui în cazul purtătorilor de translocații se datorează morții embrionilor, astfel încât un număr mare de implanturi moarte reprezintă un indiciu al prezenței unei translocații la animalul testat. Fiecare mascul F_1 care urmează să fie testat este împerecheat cu două-trei femele. Momentul concepției se stabilește prin examinarea zilnică, dimineața, în vederea decelării prezenței dopului vaginal. Femelele se sacrifică în a 14 – 16-a zi de gestație, înregistrându-se apoi implanturile vii sau moarte din uterul fiecăreia.

(b) Analiză citogenetică

Preparatele testiculare se obțin prin tehnica de uscării la aer. Purtătorii de translocații se identifică prin prezența configurațiilor multivalente la diachineză-metafaza I la nivelul spermatociților primari. Prezența a cel puțin două celule cu asociații multivalente constituie dovada necesară că animalul testat este purtătorul unei translocații.

Dacă nu s-a produs nici o selecție prin analiza reproducerii, toți masculii F_1 se examinează citogenetic. Se analizează microscopic cel puțin 25 de celule în faza de diachineză-metafaza I pentru fiecare mascul. Examinarea metafazei mitotice în spermatogonii sau în măduva osoasă este necesară la masculii F_1 cu testicule mici și rupere meiotică înainte de diachineză sau la femele F_1 suspecte de a fi XO. Prezența unui cromozom neobișnuit de lung și/sau scurt în fiecare a zecea celulă indică o translocație specială care induce sterilitatea masculului (tip c-t). Anumite translocații X-autozome care determină sterilitatea masculină pot fi identificate numai printr-o serie de analize ale benzilor de cromozomi mitotici. Prezența a 39 de cromozomi în toate cele 10 mitoze indică starea XO la o femelă.

2. **DATE**

Datele sunt prezentate sub formă de tabele.

Mărimea medie a seriei de pui și raportul numeric între sexe se înregistrează de la naștere până la înțărcare pentru fiecare perioadă de împerechere.

Pentru evaluarea fertilității animalelor F_1, se prezintă mărimea medie a seriei de pui pentru toate împerecherile normale și mărimea fiecărei serii de pui proveniți din animale F_1 purtătoare de translocații. Pentru examinarea conținutului uterin se specifică numărul mediu al implanturilor vii și moarte în împerecherile normale și numărul implanturilor vii și moarte pentru fiecare împerechere a purtătorilor de translocații F_1.

Pentru analiza citogenetică a diachineză-metafazei I, se înregistrează numărul tipurilor de configurații multivalente și numărul total de celule pentru fiecare purtător de translocații.

Pentru fiecare exemplar F_1 steril se raportează numărul total de împerecheri și durata perioadei de împerechere. Se fac analize citogenetice detaliate și se cântăresc testiculele.

Pentru femelele XO se specifică mărimea medie a seriei de pui, raportul numeric dintre sexe la descendența F_2 și rezultatele analizei citogenetice.

În cazul în care posibilii purtători de translocații F_1 sunt preselecționați în teste de fertilitate, tabelele trebuie să cuprindă informații despre numărul celor care sunt confirmați cu heterozigoți de translocație.

Se raportează, de asemenea, date referitoare la experimentele pe martorii pozitivi și negativi.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— linia de șoareci, vârsta animalelor, greutatea animalelor tratate;

— numărul animalelor parentale de fiecare sex din lotul tratat și din lotul martor;

— condițiile de testare, descrierea amănunțită a tratamentului, dozele, solvenții, schema de împerechere;

— numărul și sexul descendenților pentru fiecare femelă, numărul și sexul descendenților aleși pentru analiza de translocație;

— momentul și criteriile analizei de translocație;

— numărul și descrierea amănunțită a purtătorilor de translocații, inclusiv date privind reproducerea și conținutul uterin, după caz;

— metode citogenetice și detalii asupra analizei microscopice, preferabil cu imagini;

— evaluarea statistică;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. **Evaluare și interpretare**

A se vedea introducerea generală, partea B.

4. **REFERINȚE**

A se vedea introducerea generală, partea B.

PARTEA C: METODE DE DETERMINARE A ECOTOXICITĂȚII

INTRODUCERE GENERALĂ: PARTEA C

Metodele de testare descrise mai jos se aplică pentru determinarea unor proprietăți ecotoxicologice enumerate în anexa VIII la Directiva 79/831/CEE. Declaranții trebuie să aibă în vedere că metodele pentru determinarea următoarelor proprietăți, prevăzute în nivelul 1 al anexei VIII, nu sunt incluse în text:

— studiu de toxicitate prelungită la *Daphnia magna*;

— test pe o plantă superioară;

— studiu de toxicitate prelungită la pești;

— test de acumulare la o specie.

Atunci când vor fi definitivate metode de testare adecvate pentru determinarea acestor proprietăți, acestea vor fi publicate sub forma unei noi adaptări la progresul tehnic. Între timp, declaranții trebuie să utilizeze metode corespunzătoare, recunoscute internațional, pe care le notifică autorității competente.

TEST DE INHIBIȚIE A CREȘTERII ALGELOR

1. METODĂ

1.1. Introducere

Scopul acestui test este stabilirea efectelor unei substanțe asupra creșterii speciilor de alge verzi unicelulare. Testele de durată relativ scurtă pot estima efectele asupra câtorva generații. Această metodă poate fi adaptată astfel încât să fie utilizată în cazul mai multor specii de alge unicelulare, caz în care raportul de testare trebuie însoțit de descrierea metodei.

Această metodă este cel mai ușor de aplicat în cazul substanțelor solubile în apă, care, în condițiile de testare, prezintă o probabilitate mare de a rămâne în apă.

Pentru substanțele cu o solubilitate limitată în mediul de testare, determinarea cantitativă CE_{50} ar putea fi imposibilă (a se vedea definițiile de mai jos).

Metoda poate fi folosită pentru substanțele care nu interferează direct cu măsurarea creșterii algelor.

Următoarele informații pot fi utile la efectuarea acestui test:

— solubilitatea în apă;

— presiunea vaporilor;

— formula structurală;

— puritatea substanței;

— stabilitatea chimică în apă și la lumină;

— metode de analiză cantitativă a substanței în apă;

— valoarea pK_a;

— coeficientul de partiție n-octanol/apă;

— rezultatele unui test de biodegradabilitate rapidă.

1.2. Definiții și unități de măsură

Concentrația celulară: numărul de celule/mililitru;

Creștere: creșterea concentrației celulare în perioada de testare;

Rata de creștere: creșterea concentrației celulare pe unitate de timp;

CE_{50}: în această metodă, reprezintă concentrația substanței de testat care determină o reducere cu 50 % fie a creșterii, fie a vitezei de creștere în comparație cu martorul.

NOEC (concentrația pentru care nu se observă nici un efect): în această metodă, cea mai mare concentrație testată la care parametrul măsurat (parametrii măsurați) nu indică nici un efect semnificativ de inhibiție a creșterii în comparație cu valorile martorului.

1.3. Substanțe de referință

O substanță de referință poate fi testată ca mijloc de identificare a condițiilor de testare nesatisfăcătoare. Dacă se utilizează o substanță de referință, rezultatele se indică în raportul de testare. Dicromatul de potasiu poate fi utilizat ca substanță de referință.

1.4. Principiul metodei de testare

Culturi cu creștere exponențială de alge verzi selecționate se expun la acțiunea diferitelor concentrații de substanță de testat, pe câteva generații, în condiții definite. Se determină inhibiția creșterii prin comparație cu o cultură martor într-o perioadă definită.

1.5. **Criterii de calitate**

1.5.1. *Condiții pentru validitatea testului*

Concentrația celulară din culturile martor trebuie să crească cu un factor de cel puțin 16 în decurs de trei zile.

Dispariția substanței de testat din apă în biomasă nu invalidează în mod necesar testul.

1.6. **Descrierea metodei de testare**

1.6.1. *Pregătire*

1.6.1.1. Echipament și materiale

— echipament obișnuit de laborator;

— baloane de testare cu un volum adecvat (de exemplu, baloanele Erlenmeyer de 250 ml sunt adecvate dacă volumul soluției de testare este de 100 ml);

— aparat de cultură: laboratorul sau incinta în care se poate menține o temperatură în limita de 21-25 °C, ± 2 °C și o iluminare continuă uniformă în gama spectrală 400-700 nm. (Se recomandă un flux cuantic de $0{,}72 \times 10^{20}$ fotoni/m^2s ± 20 %. Acest flux cuantic este egal ce 120 µE/m^2s și se poate obține cu lămpi fluorescente de 30 W de tip universal alb (temperatura luminii de aproximativ 4 200 K), emițând aproximativ 8 000 de lucși măsurați cu un colector sferic;

— aparat pentru determinarea concentrației celulare, de ex. contoare de particule electronice, microscoape cu incinte de numărare, fluorimetru, spectrofotometru, colorimetru (*Notă:* Pentru a obține măsurători utile la concentrații celulare mici prin utilizarea unui spectrofotometru, ar putea fi necesară utilizarea cuvetelor cu fanta de cel puțin 4 cm).

1.6.1.2. Mediul pentru alge

Se recomandă următorul mediu:

NH_4Cl:	15	mg/l,
$MgCl_2.6H_2O$:	12	mg/l,
$CaCl_2.2H_2O$:	18	mg/l,
$MgSO_4.7H_2O$:	15	mg/l,
KH_2PO_4:	1,6	mg/l,
$FeCl_3.6H_2O$:	0,08	mg/l,
$Na_2EDTA.2H_2O$:	0,1	mg/l,
H_3BO_3	0,185	mg/l,
$MnCl_2.4H_2O$:	0,415	mg/l,
$ZnCl_2$:	3×10^{-3}	mg/l,
$CoCl_2.6H_2O$:	$1{,}5 \times 10^{-3}$	mg/l,
$CuCl_2.2H_2O$:	10^{-5}	mg/l,
$Na_2MoO_4.2H_2O$:	7×10^{-3}	mg/l,
$NaHCO_3$:	50	mg/l.

După echilibrarea cu aer, pH-ul mediului este de aproximativ 8.

Folosirea altor medii nu este exclusă de recomandarea de mai sus, sub rezerva respectării următoarelor limite ale compușilor de bază:

P:	≤ 0,7 mg/l,
N:	≤ 10 mg/l,
chelatori:	≤ 10^{-3} mmol/l,
duritate (Ca + Mg):	≤ 0,6 mmol/l.

Mediul recomandat și mediul din referință (1) satisfac această cerință.

1.6.1.3. Organisme de experiență

Selectarea speciilor

Se recomandă utilizarea de specii de alge verzi cu creștere rapidă, care prezintă avantaje pentru cultură și testare. Se preferă următoarele specii:

— *Selenastrum capricornutum*, de exemplu, ATCC 22662;

— *Scenedesmus subspicatus*, de exemplu, 86.81 SAG;

— *Chlorella vulgaris*, CCAP 211/11b.

Dacă se folosesc alte specii, trebuie raportată linia.

1.6.1.4. Planul testului

Concentrația celulară inițială

Concentrația celulară inițială recomandabilă pentru culturile testate este de circa 10^4 celule/ml pentru *Selenastrum capricornutum*și *Scenedesmus subspicatus*. Dacă se folosesc alte specii, biomasa trebuie să fie comparabilă.

Concentrațiile substanței de testat

Gama de concentrații în cadrul căreia ar putea apărea efecte se stabilește pe baza rezultatelor din testele preliminare. Pentru testare, se aleg cel puțin cinci concentrații dispuse în progresie geometrică. La concentrațiile minime testate nu trebuie să se observe nici un efect asupra creșterii algelor. Concentrația maximă testată trebuie să inhibe creșterea cu cel puțin 50 % față de martor și, de preferință, să o oprească total.

Replici și martori

Planul testului include, de preferință, trei replici la fiecare concentrație de testare și, în mod ideal, un număr dublu de martori. Dacă se justifică, planul testului poate fi modificat astfel încât să se mărească numărul de concentrații și să se reducă numărul de replici per concentrație.

Dacă se folosește un vehicul pentru solubilizarea substanței de testat, planul testului include martori suplimentari, care conțin vehiculul în concentrațiile maxime folosite în culturile de testare.

1.6.2. *Efectuarea testului*

Prezenta secțiune cuprinde orientări pentru testarea substanțelor ușor solubile, a substanțelor puțin solubile, precum și a substanțelor volatile.

1.6.2.1. Testarea substanțelor ușor solubile în apă

Culturile de testare care conțin concentrațiile dorite ale substanței de testat și cantitatea dorită de inocul din alge se prepară prin diluarea unor cantități alicote din soluția mamă de substanță de testat și din suspensia de alge, cu un mediu de alge filtrat.

Baloanele conținând culturile se agită și se așază în aparatul de cultură. Pe parcursul testului este necesară păstrarea algelor în suspensie și facilitarea transferului de CO_2. În acest scop, se poate recurge la agitare, amestecare sau aerare. Culturile trebuie păstrate la o temperatură cuprinsă între 21 și 25 °C, controlată într-un interval de ± 2 °C.

Concentrația celulară din fiecare balon se stabilește cel puțin la 24, 48 și 72 de ore de la începutul testului. Se folosește mediu de alge filtrat pentru determinarea fondului, atunci când se utilizează contoare de particule, sau ca probă martor, atunci când se utilizează spectrofotometre.

Valoarea pH-ului se înregistrează la începutul testului și la 72 de ore.

Pe parcursul testului, pH-ul soluțiilor nu trebuie în mod normal să devieze cu mai mult de o unitate.

1.6.2.2. Testarea substanțelor cu solubilitate limitată în apă

Dacă solubilitatea substanței de testat este de ordinul concentrației maxime folosite în test, sunt necesare doar abateri ușoare de la metoda de mai sus pentru prepararea soluțiilor de testare. O soluție saturată poate servi ca soluție mamă a substanței de testat. O altă posibilitate poate consta în dizolvarea substanței de testat la concentrația dorită în mediul de alge înaintea introducerii suspensiei de alge.

Soluțiile mamă ale substanțelor cu solubilitate scăzută în apă se pot prepara prin dispersie mecanică sau prin utilizarea unor vehicule cu toxicitate redusă față de alge, cum ar fi solvenții organici, emulsifianții sau dispersanții. Dacă se utilizează un vehicul, concentrația nu trebuie să depășească 100 mg/litru, iar în planul testului trebuie incluși martori suplimentari, în care se încorporează vehiculul la cea mai mare concentrație prezentă în soluțiile de testare.

1.6.2.3. Testarea substanțelor volatile

Nu există o modalitate general acceptată de testare a substanțelor volatile. Atunci când se cunoaște că o substanță are tendința de evaporare, se pot folosi baloane de testare închise, cu spațiul liber între dop și nivelul lichidului. S-au propus variante ale acestei metode [a se vedea referința (1)].

Trebuie făcute încercări pentru a se determina cantitatea de substanță care rămâne în soluție și se recomandă o atenție deosebită la interpretarea rezultatelor testelor cu substanțe chimice volatile folosind sisteme închise.

2. **DATE ȘI EVALUARE**

Concentrațiile celulare măsurate în culturile de testare și culturile martor se înregistrează în tabele împreună cu concentrațiile substanței de testat și momentul măsurătorilor. Valoarea medie a concentrațiilor celulare pentru fiecare concentrație a substanței de testat și pentru martori se reprezintă în funcție de timp pentru a obține curbele de creștere.

Pentru a se determina relația concentrație/efect, se folosesc următoarele două metode.

2.1. **Compararea suprafețelor de sub curbele de creștere**

Suprafața dintre curbele de creștere și linia orizontală se poate calcula după următoarea formulă:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

unde:

A = zona,

N_0 = număr de celule/ml la momentul t_0,

N_1 = număr de celule/ml la momentul t_1,

N_n = număr de celule/ml la momentul t_n,

t_1 = momentul primei măsurători după începerea testului,

t_n = momentul cele de-a *n*-a măsurători după începerea testului.

Procentul de inhibiție a creșterii celulare la fiecare concentrație a substanței de testat (I_A) se calculează ca diferența dintre zona de sub curba de creștere martor (A_c) și zona de sub curba de creștere la fiecare concentrație a substanței de testat (A_t) prin formula:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

Valorile I_A se reprezintă pe hârtie semilogaritmică sau pe hârtie semilogaritmică probit în funcție de concentrațiile corespunzătoare. Dacă se reprezintă pe hârtie probit, punctele se unesc printr-o dreaptă trasată cu ochiul liber sau se poate trasa o dreaptă de regresie calculată, atunci când se poate aproxima o distribuție log-normală a valorilor.

Valoarea CE_{50} rezultă din intersectarea dreptei de regresie cu paralela la abscisă trasată la I_A = 50 %. Pentru a nota această valoare fără ambiguitate în raport cu prezenta metodă de calcul, se propune folosirea simbolului CE_{b50}. În prezenta metodă, care specifică măsurători la 24, 48 și 72 de ore, simbolul devine CE_{b50} (0–72 ore).

Alte valori CE, cum ar fi CE_{b10} pot fi, de asemenea, obținute din reprezentarea grafică I_A în funcție de logaritmul concentrației.

2.2. **Compararea vitezelor de creștere**

Viteza medie specifică de creștere (μ) pentru culturile cu o creștere exponențială se poate calcula conform formulei:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

În mod alternativ, viteza medie specifică de creștere se poate calcula din panta dreptei de regresie în reprezentarea grafică a ln N în funcție de timp.

Procentul de inhibiție a vitezei specifice de creștere la fiecare concentrație a substanței de testat în comparație cu valoarea martor se reprezintă grafic în funcție de logaritmul concentrației. Se pot citi valorile CE_{50} pe curba rezultată. Pentru notarea fără ambiguitate a CE_{50} calculată această metodă, se propune utilizarea simbolului CE_{b50}. Trebuie să se indice timpii de măsurare, de exemplu, dacă valoarea se referă la măsurători la 24 și 48 ore, simbolul devine CE_{r50} (24–48 ore).

Notă: viteza specifică de creștere are expresie logaritmică, iar micile modificări ale vitezei de creștere pot conduce la modificări mari ale biomasei. Prin urmare, valorile CE_b și CE_r nu sunt comparabile numeric.

3. **RAPORT**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— substanța de testat: datele de identificare a substanței chimice;

— organismele de testare: originea, cultura de laborator, numărul sușei, metoda de cultivare;

— condiții experimentale:

  — data testului începerii și încheierii testului, precum și durata acestuia;

  — temperatura;

— compoziția mediului;

— aparatul de cultură;

— pH-ul soluției la începutul și sfârșitul testului (trebuie să se furnizeze explicații dacă se observă variații ale pH-ului cu mai mult de 1 unitate);

— vehiculul și metoda folosite pentru solubilizarea substanței de testat și concentrația vehiculului în soluțiile de testare;

— intensitatea și calitatea luminii;

— concentrațiile testate (măsurate sau nominale).

— Rezultate:

— concentrația celulară pentru fiecare balon în fiecare punct de măsurare și metoda utilizată pentru măsurarea concentrației celulare;

— valorile medii ale concentrației celulare;

— curbele de creștere;

— reprezentarea grafică a relației concentrație–efect;

— valorile CE și metoda de calcul;

— NOEC;

— alte efecte observate.

4. **REFERINȚE**

(1) OCDE, Paris 1981, *Linii directoare privind testele 207*, Decizia Consiliului C(81) 30 final.

(2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, „*Verfahrensvorschlag Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge* Scenedesmus subspicatus", in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

Apendice

EXEMPLU DE METODĂ DE CULTURĂ A ALGELOR

Observații generale

Scopul cultivării pe baza metodei de mai jos este acela de a obține culturi de alge pentru studii de toxicitate.

Se folosesc metode adecvate pentru a garanta lipsa infectării cu bacterii a culturilor de alge (ISO 4833). Este preferabil să se utilizeze culturi axenice, dar este esențial ca acestea să fie constituite dintr-o singură specie de alge.

Toate operațiunile se efectuează în condiții sterile pentru a evita contaminarea cu bacterii și alte alge.

Echipamente și materiale

A se vedea 1.6.1: Pregătire și organisme de experiență

Metode pentru obținerea culturilor de alge

Prepararea soluțiilor nutritive (medii)

Toate sărurile nutritive ale mediului se prepară ca soluții mamă concentrate și se păstrează la întuneric și temperaturi scăzute. Aceste soluții se sterilizează prin filtrare sau autoclavizare.

Mediul se prepară prin adăugarea cantităților corecte de soluții mamă în apă distilată sterilă, având grijă să nu aibă loc infectări. Pentru mediul solid se adaugă 0,8 % agar-agar.

Cultura mamă

Culturile mamă sunt culturi mici de alge care se transferă cu regularitate într-un mediu proaspăt pentru a acționa ca material de testare inițial. Dacă nu sunt folosite cu regularitate, ele sunt însămânțate pe suprafața tuburilor înclinate acoperite cu agar-agar. Culturile se transferă într-un mediu proaspăt cel puțin o dată la 2 luni.

Culturile mamă se cresc în baloane Erlenmeyer care conțin mediul corespunzător (volum de aproximativ 100 ml). Atunci când algele sunt incubate la 20 °C cu iluminare continuă, este necesar un transfer săptămânal.

În timpul transferului o cantitate din cultura „veche" se transferă cu pipete sterile într-un balon cu mediu proaspăt, astfel încât în cazul speciilor cu creștere rapidă concentrația inițială să fie de aproximativ 100 ori mai mică decât în cultura veche.

Viteza de creștere a speciei se poate determina din curba de creștere. Dacă aceasta se cunoaște, este posibil să se estimeze densitatea la care cultura trebuie transferată într-un mediu nou. Acest lucru trebuie să se facă înainte ca algele din cultură să atingă faza morții.

Precultura

Precultura are ca scop obținerea unei cantități de alge adecvată pentru inocularea culturilor de testare. Precultura se incubează în condițiile de testare și se folosește în faza de creștere exponențială, în mod normal după o perioadă de incubare de aproximativ trei zile. Când culturile de alge conțin celule deformate sau anormale, acestea trebuie eliminate.

TOXICITATEA LA RÂME

TEST PE SOL ARTIFICIAL

1. **METODĂ**

1.1. **Introducere**

În acest test de laborator substanța de testat se adaugă la un sol artificial în care se plasează râme timp de 14 zile. După această perioadă (și opțional după 7 zile) se examinează efectul letal al substanței pe râme. Testul reprezintă o metodă pentru determinarea pe termen relativ scurt a efectului substanțelor chimice pe râme prin absorbție cutanată și prin ingestie.

1.2. **Definiție și unitate**

CL_{50}: concentrația unei substanțe care este statistic responsabilă pe parcursul unei expuneri de moartea a 50 % din animalele expuse pe durata testului.

1.3. **Substanța de referință**

Se folosește periodic o substanță de referință ca modalitate de a demonstra că sensibilitatea sistemului de testare nu s-a schimbat semnificativ.

Se recomandă ca substanță de referință cloracetamida de puritate analitică.

1.4. **Principiul testului**

Solul fiind un mediu variabil, pentru acest test se folosește un sol artificial de argilă cu caracteristici definite cu atenție. Râmele adulte din specia *Eisenia foetida* (a se vedea nota din apendice) sunt ținute într-un sol artificial, definit, tratat cu diferite concentrații ale substanței de testat. Conținutul recipientelor este așezat pe o tavă după 14 zile (opțional 7 zile) de la începerea testului și se numără râmele care au supraviețuit fiecărei concentrații.

1.5. **Criterii de calitate**

Testul este conceput astfel încât să fie cât se poate de reproductibil cu privire la substratul de testare și organism. Dacă mortalitatea în loturile martor depășește 10 % la sfârșitul testului, acesta este invalidat.

1.6. **Descrierea metodei de testare**

1.6.1. *Materiale*

1.6.1.1. Substrat de testare

Ca substrat de bază se folosește un sol artificial definit.

(a) Substratul de bază (procente exprimate în greutate uscată)

— 10 % mușchi de turbă (cât se poate de aproape de pH 5,5 la 6,0 și pe cât posibil fără resturi vizibile de plante și pământ);

— 20 % argilă caolinică, de preferat cu mai mult de 50 % caolinit;

— aproximativ 69 % nisip industrial de cuarț (mai mult de 50 % nisip fin cu dimensiunea particulelor de la 0,05 mm până la 0,2 mm). Dacă substanța nu se dispersează suficient în apă, trebuie păstrată o cantitate de 10 g nisip/recipient de testare pentru amestecare ulterioară cu substanța de testat;

— aproximativ 1 % carbonat de calciu ($CaCO_3$) pulbere, chimic pur, adăugat pentru a ajusta pH-ul la 6,0 ± 0,5;

(b) Substratul de testare

Substratul de testare conține substratul de bază, substanța de testat și apă deionizată.

Conținutul de apă este de aproximativ 25 – 42 % din greutatea uscată a substratului de bază. Conținutul de apă al substratului este determinat aducând la greutate constantă un eșantion, prin uscare la 105 °C. Criteriul cheie este acela că solul artificial trebuie udat așa încât apa să nu ajungă să băltească. Amestecarea se face cu grijă pentru a se obține o distribuție uniformă a substanței de testat și a substratului. Modul de introducere a substanței de testat în substrat trebuie trecut în raportul de testare;

(c) Substratul martor

Substratul martor conține substratul de bază și apă. Dacă se folosește un aditiv, se adaugă un substrat martor suplimentar care trebuie să conțină aceeași cantitate de aditiv.

1.6.1.2. Recipiente de testare

Recipiente de sticlă cu o capacitate de aproximativ 1 l (acoperite adecvat cu capace de plastic, discuri sau foi de plastic cu perforații de aerisire) umplute cu o cantitate de substrat de testare umed sau substrat martor umed, echivalent cu 500 g de substrat uscat.

1.6.2. *Condiții experimentale*

Recipientele trebuie păstrate în incinte climatizate la o temperatură de 20 °C ± 2 °C cu lumină continuă. Intensitatea luminii trebuie să fie de 400 – 800 de lucși.

Perioada de testare este de 14 zile, dar mortalitatea poate fi evaluată opțional la 7 zile de la începerea testului.

1.6.3. *Mod de operare*

Concentrațiile substanței de testat

Concentrațiile substanței de testat sunt exprimate ca raport între masa substanței și masa substratului de bază uscat (mg/kg).

Testul preliminar

Intervalul de concentrații care provoacă mortalități de 0 – 100 % se poate determina printr-un test preliminar, care să ofere informații despre intervalul de concentrații ce trebuie folosite în testul definitiv.

Substanța trebuie testată la următoarele concentrații: 1 000; 100; 10; 1 și 0,1 mg substanță/kg substrat de testare (greutate uscată).

Dacă urmează să se efectueze un test final, complet, un lot per concentrație și un lot pentru martorul netratat, fiecare cu câte 10 râme, pot fi suficiente pentru testul preliminar.

Testul definitiv

Rezultatele testului preliminar se folosesc pentru a selecta cel puțin 5 concentrații într-o serie geometrică din domeniul 0 - 100 % mortalitate, care diferă cu un raport constant de maximum 1,8.

Testele în care se folosesc aceste serii de concentrații trebuie să permită, cu cea mai mare precizie posibilă, estimarea valorii CL_{50} și a limitelor de încredere.

În testul definitiv se folosesc 4 loturi de testare per concentrație și 4 loturi martor netratate, fiecare cu 10 râme. Rezultatele acestor loturi replicate se prezintă ca medie, precizându-se deviația standard.

Dacă două concentrații consecutive aflate în raport de 1,8 dau numai 0 % și 100 % mortalitate, aceste două valori sunt suficiente pentru a indica intervalul în care se află CL_{50}.

Amestecul de substrat de bază și substanță testată

Dacă este posibil, substratul de testare trebuie preparat fără agenți suplimentari alții decât apa. Imediat înainte de începerea testului, o emulsie sau dispersie de substanță de testat în apă deionizată sau alt solvent se amestecă cu substratul de bază sau este pulverizată uniform peste el, cu un pulverizator de cromatografie fină sau similar.

Dacă este insolubilă în apă, substanța de testat se poate dizolva într-un volum cât se poate de mic de solvent organic adecvat (de exemplu, hexan, acetonă sau cloroform).

Se pot folosi numai agenți care se volatilizează rapid pentru a solubiliza, dispersa sau emulsiona substanța de testat. Substratul trebuie aerisit înainte de utilizare. Cantitatea de apă evaporată trebuie înlocuită. Martorul trebuie să conțină aceeași cantitate din orice aditiv.

Dacă substanța de testat nu este solubilă, dispersabilă sau emulsionabilă în solvenți organici, se amestecă 10 g de nisip de cuarț fin măcinat cu o cantitate de substanță de testat necesară pentru a trata 500 g de sol artificial uscat cu 490 g de substrat de testare uscat.

Pentru fiecare lot, o cantitate de substrat de testare umed echivalent cu 500 g greutate uscată se plasează în fiecare recipient din sticlă și 10 râme care au fost ținute 24 de ore într-un substrat de bază umed similar, apoi clătite rapid, surplusul de apă fiind absorbit pe hârtie de filtru sunt așezate pe substratul de testare.

Recipientele se acoperă cu capace de plastic, discuri sau foi de plastic perforate pentru a împiedica uscarea substratului și sunt ținute în condiții de testare 14 zile.

Evaluările trebuie făcute după 14 zile (opțional 7 zile) de la începerea testului. Substratul se întinde pe o placă de sticlă sau oțel inoxidabil. Râmele se examinează și se determină numărul de râme supraviețuitoare. Râmele se consideră moarte dacă nu răspund la un stimul mecanic ușor, aplicat în extremitatea anterioară.

Dacă examinarea are loc la 7 zile, recipientul se reumple cu substrat, iar râmele supraviețuitoare se așază pe același substrat de testare.

1.6.4. *Organisme de experiență*

Organismele de testare trebuie să fie *Eisenia foetida* adulte (a se vedea nota din apendice) (în vârstă de cel puțin 2 luni, cu clitellum) cu o greutate umedă de 300 – 600 mg (pentru metoda de reproducere, a se vedea apendicele).

2. **DATE**

2.1. **Interpretarea și evaluarea rezultatelor**

Concentrațiile substanței de testat se raportează la procentele corespunzătoare de mortalitate a râmelor.

Dacă datele sunt adecvate, valoarea CL_{50} și limitele de încredere (p = 0,05) se determină prin metode standard (Litchfield și Wilcoxon, 1949, pentru metoda echivalentă). CL_{50} se exprimă în mg de substanță de testat pe kg de substrat de testare (greutate uscată).

În cazurile în care panta curbei de concentrație este prea mare pentru a permite calculul CL_{50}, este suficientă o estimare grafică a acestei valori.

Dacă două concentrații consecutive aflate în raport de 1,8 dau numai 0 % și 100 % mortalitate, cele două valori sunt suficiente pentru a indica intervalul în care se află CL_{50}.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— declarația de conformitate a testului cu criteriile de calitate menționate mai sus;

— testul realizat (testul preliminar și/sau testul definitiv);

— descrierea exactă a condițiilor experimentale sau a declarației de conformitate a testului cu metoda; trebuie raportată orice abatere;

— descrierea exactă a modului în care s-a amestecat substanța de testat în substratul de bază;

— informații despre organismele testate (specia, vârsta, media și gama de greutate, condiții de păstrare și reproducere, furnizor);

— metoda folosită pentru determinarea CL_{50};

— rezultatele testului, inclusiv toate datele folosite;

— descrierea simptomelor observate sau a modificărilor de comportament ale organismelor testate;

— mortalitatea la loturile martor;

— CL_{50} sau cea mai mare concentrație testată fără mortalitate și concentrația minimă testată cu mortalitate de 100 % la 14 zile (și opțional 7 zile) de la începerea testului;

— trasarea curbei concentrație/răspuns;

— rezultatele obținute cu substanța de referință, fie în cadrul testului de față, fie în cel al unor teste anterioare de control al calității.

4. **REFERINȚE**

(1) OCDE, Paris, 1981, *Linii directoare privind testele 207,* Decizia Consiliului C(81) 30 final.

(2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, *Biology of Earthworms*, Chapman and Hall, London, 331 pp.

(3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Ecologie et Systématique*, Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.

(4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., *A simplified method of evaluation dose effect experiments,* J. Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, p. 99.

(5) Comisia Comunităților Europene, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*, Report EUR 8714 EN, 1983.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt fur Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, *Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm* Eisenia foetida *in künstlichem Boden", in*: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

Apendice

Reproducerea şi păstrarea râmelor înainte de testare

Pentru reproducerea organismelor, 30 până la 50 de râme adulte sunt puse într-o cutie de reproducere, cu substrat proaspăt, și scoase după 14 zile. Aceste organisme se pot folosi ulterior pentru alte loturi de reproducere. Râmele scoase din coconi se folosesc pentru testare când ajung la maturitate (în condițiile cerute, după 2-3 luni).

Condiții de păstrare și reproducere

Incinta climatizată:	temperatura 20 °C ± 2 °C de preferință cu lumină continuă (intensitatea 400 până la 800 de lucşi).
Cutii de reproducere:	recipiente puțin adânci, cu o capacitate de 10-20 l.
Substrat:	*Eisenia foetida* se poate reproduce în diferite excremente de animale. Se recomandă să se folosească ca mediu de reproducere un amestec de 50 % volum turbă și 50 % bălegar de vacă sau cal. Mediul trebuie să aibă o valoare a pH-ului de 6-7 (ajustată cu carbonat de calciu) și o conductivitate ionică scăzută (mai puțin de 6 mmhos sau 0,5 % concentrație de sare).
	Substratul trebuie să fie umed, dar nu foarte ud.
	Se pot folosi alte metode de succes pe lângă metoda prezentată mai sus.

Notă: Unii taxonomiști au împărțit *Eisenia foetida* în două specii (Bouche, 1972). Acestea sunt morfologic similare, dar una, *Eisenia foetida foetida* prezintă dungi transversale tipice pe segmente, în timp ce a doua, *Eisenia foetida andrei* nu are aceste dungi și are o culoare roșiatică, cu pete. Dacă este posibil, se recomandă folosirea speciei *Eisenia foetida andrei*. Dacă este disponibilă metodologia necesară, se pot folosi alte specii.

BIODEGRADARE

METODA ZAHN-WELLENS

1. **METODĂ**

1.1. **Introducere**

Scopul acestei metode este evaluarea potențialului de biodegradabilitate totală al substanțelor organice nevolatile solubile în apă, atunci când sunt expuse la concentrații relativ mari de microorganisme într-un test static.

Pe materiile solide în suspensie poate avea loc adsorbția fizico-chimică, iar acest aspect trebuie luat în considerare la interpretarea rezultatelor (a se vedea 3.2).

Substanțele de studiat se folosesc în concentrații corespunzătoare valorilor COD în intervalul 50 până la 400 mg/l, sau valorilor CCO în intervalul 100 până la 1 000 mg/l (COD = carbon organic dizolvat; CCO = consum chimic de oxigen). Aceste concentrații relativ mari garantează o bună fiabilitate analitică. Compușii cu proprietăți toxice pot întârzia sau inhiba procesul de degradare.

În această metodă se folosește măsurarea concentrației de carbon organic dizolvat sau a consumului chimic de oxigen pentru a evalua biodegradabilitatea totală a substanței de testat.

Folosirea simultană a unei metode analitice specifice permite evaluarea biodegradabilității primare a substanței (dispariția structurii chimice inițiale).

Metoda este aplicabilă numai acelor substanțe organice testate care la concentrația folosită în test:

— sunt solubile în apă în condițiile experimentale;

— au o presiune a vaporilor neglijabilă în condițiile experimentale;

— nu sunt inhibitoare pentru bacterii;

— sunt adsorbite în sistemul de testare numai în cantități limitate;

— nu se pierd prin spumare din soluția testată.

Informațiile despre proporțiile relative ale principalelor componente ale compusului testat se utilizează la interpretarea rezultatelor obținute, în special în cazurile în care rezultatele indică valori scăzute sau marginale.

Informațiile despre acțiunea toxică a substanței de testat asupra microorganismelor se folosesc pentru interpretarea rezultatelor cu valori scăzute și pentru selecția concentrațiilor testate corespunzătoare.

1.2. **Definiții și unități**

Gradul de degradare atins la sfârșitul testului se raportează ca „Biodegradabilitate în testul Zahn-Wellens”:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

unde:

D_T = gradul de biodegradare exprimat în % la momentul T;

C_A = valori COD sau (CCO) în amestecul testat, măsurate la trei ore după începerea testului (mg/l) (COD = carbon organic dizolvat, CCO = consum chimic de oxigen);

C_T = valori COD sau CCO în amestecul testat la momentul prelevării probelor (mg/l);

C_B = valori COD sau CCO ale probei martor la momentul prelevării probelor (mg/l);

C_{BA} = valorile COD sau CCO ale probei martor, măsurate la trei ore de la începerea testului (mg/l).

Gradul de degradare se rotunjește la cel mai apropiat procent întreg.

Procentul de degradare se exprimă ca procent de îndepărtare a COD (sau CCO) din substanța de testat.

Diferența dintre valoarea măsurată după trei ore și valoarea inițială calculată sau, de preferință, măsurată poate furniza informații utile cu privire la eliminarea substanței (a se vedea 3.2 Interpretarea rezultatelor).

1.3. **Substanțe de referință**

În anumite cazuri, când se studiază substanțe noi, substanțele de referință pot fi utile; cu toate acestea, nu se pot recomanda încă substanțe de referință specifice.

1.4. **Principiul metodei de testare**

Nămolul activ, substanțe nutritive minerale și substanța de testat – ca singură sursă de carbon în soluția apoasă – se introduc împreună într-un recipient din sticlă cu o capacitate de 1 până la 4 l, prevăzut cu un dispozitiv de agitare și un aerator. Amestecul se agită și se aerează la 20 – 25 °C, în condiții de iluminare difuză sau într-o incintă întunecată, timp de până la 28 de zile. Procesul de degradare se monitorizează prin determinarea valorilor COD (sau CCO) în soluție filtrată, zilnic sau la alte intervale egale de timp adecvate. Raportul dintre COD (sau CCO) eliminat după fiecare interval și valoarea constatată la trei ore după începerea testului se exprimă ca procent de biodegradare și servește ca măsură a gradului de degradare în acel moment. Procentele se reprezintă grafic în funcție de timp, formând curba de biodegradare.

Atunci când se folosește o metodă analitică specifică, se pot măsura schimbările în concentrația moleculei primare datorate biodegradării (biodegradabilitate primară).

1.5. **Criterii de calitate**

Reproductibilitatea acestui test s-a dovedit a fi satisfăcătoare în cadrul unui test de comparație interlaboratoare.

Sensibilitatea metodei este determinată în mare măsură de variabilitatea probei martor și într-o mai mică măsură de precizia determinării carbonului organic dizolvat și nivelul compusului de testat în soluție.

1.6. **Descrierea modului de operare**

1.6.1. *Pregătire*

1.6.1.1. Reactivi

Apa de testare: apă potabilă cu conținut de carbon organic < 5 mg/l. Concentrația de ioni de magneziu și calciu, luate împreună, nu trebuie să depășească 2,7 mmol/l, altfel este necesară o diluare adecvată cu apă deionizată sau distilată.

Acid sulfuric, puritate analitică (p.a.)	50 g/l.
Soluție de hidroxid de sodiu p.a.	40 g/l.
Soluție nutritivă minerală: dizolvare într-un litru de apă deionizată:	
Clorură de amoniu, NH_4Cl, p.a.	38,5 g,
Dihidrogenofosfat de sodiu, $NaH_2PO_4,.\ 2H_2O$ p.a.:	33,4 g,
Dihidrogenofosfat de potasiu, KH_2PO_4 p.a.:	8,5 g,
Dipotasiu mono-hidrogen fosfat K_2HPO_4, p.a.:	21,75 g.

Amestecul servește atât ca substanță nutritivă, cât și ca soluție tampon.

1.6.1.2. Aparatură

Recipiente din sticlă cu un o capacitate de 1 până la 4 l (de exemplu, recipiente cilindrice).

Dispozitiv de agitare cu agitator din sticlă sau metal, pe un ax adecvat (agitatorul trebuie să se rotească la aproximativ 5 – 10 cm deasupra bazei recipientului). Se poate folosi, alternativ, un agitator magnetic cu tijă lungă de 7 – 10 cm.

Tub de sticlă cu diametrul interior de 2 – 4 mm, folosit pentru a introduce aer. Deschiderea tubului trebuie să fie de aproximativ 1 cm înălțime de la baza recipientului.

Centrifugă (aproximativ 3 550 g).

Ph-metru.

Aparat pentru măsurarea oxigenului dizolvat.

Filtre de hârtie.

Aparat de filtrare cu membrană.

Membrane de filtrare, cu dimensiunea porilor de 0,45 μm. Membranele de filtrare sunt adecvate dacă nu elimină carbon și nu adsorb substanța în faza de filtrare.

Echipament analitic pentru determinarea conținutului de carbon organic și a consumului chimic de oxigen.

1.6.1.3. Pregătirea inoculului

Nămolul activ, provenit dintr-o stație de epurare biologică, se spală prin centrifugare (repetată) sau decantare în apa de testare (a se vedea mai sus).

Nămolul activ trebuie să fie în stare corespunzătoare. Acest nămol se poate preleva de la o stație de epurare a apei uzate aflată în bună stare de funcționare. Pentru a obține cât mai multe specii sau sușe bacteriene diferite, este preferabilă amestecarea de inocul provenit din diferite surse (de exemplu, diferite stații de epurare, extracte de sol, apă de râu etc.). Amestecul trebuie tratat conform descrierii de mai sus.

Pentru verificarea activității nămolului activ, a se vedea „Controlul funcțional" de mai jos.

1.6.1.4. Pregătirea soluțiilor de testare

În recipientul de testare se adaugă: 500 ml apă de testare, 2,5 ml/l soluție nutritivă minerală, nămol activ într-o cantitate care să corespundă cu 0,2 până la 1,0 g/l substanță uscată în amestecul final. Se adăugă suficientă soluție mamă de substanță de testat, astfel încât să se obțină în amestecul final o concentrație COD de 50 – 400 mg/l. Valorile CCO corespunzătoare sunt de 100 – 1 000 mg/l. Se adăugă apă până la un volum total de 1 până la 4 l. Alegerea volumului total depinde de numărul de probe ce trebuie prelevate pentru determinările COD sau CCO și de volumele necesare pentru metoda analitică.

În mod normal, un volum de 2 litri poate fi considerat satisfăcător. Pentru fiecare serie de teste se prepară în paralel cel puțin un recipient cu probă martor; acesta conține numai nămol activ și soluție nutritivă minerală completată cu apă la același volum total ca în recipientele de testare.

1.6.2. *Modul de operare*

Recipientele de testare se agită cu agitatoare magnetice sau cu elice, în condiții de iluminare difuză, sau într-o incintă întunecată, la 20 – 25 °C. Aerarea se face cu aer comprimat, filtrat printr-un tampon de vată și, dacă este necesar, printr-un balon de spălare. Nămolul nu trebuie să se decanteze, iar concentrația de oxigen nu trebuie să scadă sub 2 mg/l.

Valoarea pH-ului se verifică periodic (de exemplu, zilnic) și, dacă este necesar, se ajustează la pH 7 – 8.

Pierderile prin evaporare se completează chiar înaintea fiecărei prelevări de probe, cu apă deionizată sau distilată în cantitățile necesare. O bună metodă este marcarea nivelului lichidului din recipientul de testare înainte de începerea testului. Noi marcaje se fac după fiecare prelevare de probe (fără aerare și amestecare). Primele probe se prelevează întotdeauna după trei ore de la începerea testului, pentru a se decela adsorbția substanței de testat pe nămolul activ.

Eliminarea substanței de testat este urmată de determinări COD sau CCO făcute zilnic sau la alte intervale egale. Probele din recipientul de testare și proba martor sunt filtrate printr-o hârtie de filtru spălată atent. Primii 5 ml de soluție filtrată se îndepărtează. Nămolurile greu de filtrat se pot înlătura anterior prin centrifugare timp de 10 minute. Determinările COD și CCO se fac cel puțin în duplicat. Testul durează 28 de zile.

Notă: Probele care rămân tulburi se filtrează prin filtrele cu membrană. Acestea nu trebuie să elimine sau să adsoarbă nici o substanță organică.

Controlul funcțional al nămolului activ

Pentru fiecare serie de teste, trebuie studiat în paralel un recipient ce conține o substanță cunoscută, astfel încât să se poată verifica capacitatea funcțională a nămolului activ. S-a observat că dietilenglicolul este util în acest scop.

Adaptare

Dacă analizele se efectuează la intervale relativ scurte (de exemplu, zilnic) adaptarea poate fi recunoscută în mod evident din curba de degradare (a se vedea figura 2). Din această cauză, testul nu trebuie să înceapă imediat înainte de sfârșitul săptămânii.

Dacă adaptarea are loc la sfârșitul perioadei, testul poate fi prelungit până când degradarea s-a încheiat.

Notă: Dacă sunt necesare cunoștințe mai ample despre comportamentul nămolului activ, același nămol activ se tratează din nou cu aceeași substanță de testat în conformitate cu metoda de mai jos:

Se oprește dispozitivul de agitare și aeratorul și se lasă nămolul activ să decanteze. Se elimină supernatantul, se umple cu până la 2 litri cu apă, se agită 15 minute și se lasă să decanteze din nou. După ce se elimină din nou supenatantul, cu nămolul rămas se repetă testul cu același compus în conformitate cu 1.6.1.4 și 1.6.2 de mai sus. Nămolul activ poate fi izolat și prin centrifugare în loc de decantare.

Nămolul adaptat poate fi amestecat cu nămol proaspăt într-o concentrație de 0,2 până la 1 g substanță uscată pe litru.

Mijloace analitice

În mod normal, probele se filtrează printr-o hârtie de filtru spălată atent (pentru spălare se folosește apă deionizată).

Probele care rămân tulburi se filtrează prin filtre cu membrană (0,45 μm).

Concentrația COD se determină pe probe duplicate din eșantioanele filtrate (primii 5 ml sunt înlăturați) cu ajutorul analizorului TOC (*total organic carbon*). Dacă filtratul nu poate fi analizat în aceeași zi, acesta trebuie păstrat în frigider până în ziua următoare. Nu se recomandă o depozitare mai îndelungată.

Concentrația CCO se determină în proba filtrată prin metoda analitică CCO inițiată de procedura descrisă în referința bibliografică (2) de mai jos.

2. DATE ȘI EVALUARE

Concentrațiile COD și/sau CCO se determină cel puțin de două ori pe probe conform 1.6.2 de mai sus. Degradarea la momentul T se calculează conform formulei (cu definiții) date la punctul 1.2 de mai sus.

Gradul de degradare se rotunjește la procentul întreg cel mai apropiat. Gradul de degradare atins la sfârșitul testului constituie „biodegradabilitatea Zahn Wellens".

Notă: Dacă are loc o degradare completă înainte de expirarea duratei testului, iar acest rezultat este confirmat de o a doua analiză efectuată în ziua următoare, testul poate fi încheiat.

3. RAPORT

3.1. Raportul de testare

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— concentrația inițială a substanței;

— toate celelalte informații și rezultatele experimentale privind substanța de testat, substanța de referință, după caz, și proba martor;

— concentrația după trei ore;

— curba de biodegradare cu descriere;

— data și locul de unde s-a prelevat nămolul activ, stadiul de adaptare, concentrația folosită etc.;

— argumentele științifice pentru orice modificare a metodei de testare.

3.2. Interpretarea rezultatelor

Eliminarea COD (CCO) care are loc treptat după zile sau săptămâni indică faptul că substanța de testat se biodegradează.

Cu toate acestea, adsorbția fizico-chimică poate să joace un rol în unele cazuri, și acest lucru este indicat de existența unei eliminări complete sau parțiale de la început, în primele trei ore, iar diferența dintre martor și supernatantul de testare rămâne la un nivel neașteptat de scăzut.

Dacă trebuie să se facă o distincție între biodegradare (sau biodegradare parțială) și adsorbție, sunt necesare teste suplimentare.

În acest scop există mai multe metode, însă cea mai convingătoare este utilizarea supernatantului sau a nămolului ca agent de inoculare într-un test din setul de bază (de preferință un test respirometric).

Substanțele de testat care duc la o eliminare avansată neadsorbtivă a COD (CCO) în acest test trebuie considerate ca potențial biodegradabil. Eliminarea parțială, neadsorbtivă, arată că substanța chimică este cel puțin biodegradabilă într-o anumită măsură. Eliminările reduse sau nule ale COD (CCO) se pot datora inhibării microorganismelor de către substanța de testat, acest lucru fiind indicat de liză și pierderea de nămol din care rezultă supernatanți tulburi. Testul se repetă cu o concentrație mai scăzută de substanță de testat.

Folosirea unei metode analitice specifice pentru compusul de testat sau a unei substanțe de testat marcate cu ^{14}C permite o sensibilitate mai mare. În cazul compusului marcat cu ^{14}C, recuperarea $^{14}CO_2$ confirmă că biodegradarea a avut loc.

Dacă rezultatele sunt exprimate în termeni de biodegradare primară, trebuie să se furnizeze, în măsura în care este posibil, o explicație cu privire la modificarea structurii chimice care duce la diminuarea răspunsului substanței inițiale.

Validarea metodei analitice trebuie însoțită de rezultatul obținut de la proba martor.

4. **REFERINȚE**

(1) OCDE, Paris, 1981, *Linii directoare privind testele 302 B*, Decizia Consiliului C(81) 30 final.

(2) Anexa V C.9. „Degradarea consumului chimic de oxigen", Directiva 84/449/CEE a Comisiei, *Jurnalul Oficial al Comunităților Europene*, nr. L 251, 19.9.1984.

Apendice

EXEMPLU DE EVALUARE

Compus organic:	4-acid etoxibenzoic
Concentrația teoretică:	600 mg/l
COD teoretic:	390 mg/l
Inocul	instalația de epurare a apei uzate …
Concentrație:	1 g material uscată/l
Adaptare:	neadaptat
Analiza:	determinarea DOC
Cantitatea de probă:	3 ml
Substanța martor:	dietilenglicol
Toxicitatea compusului:	nici un efect toxic sub 1 000 mg/l Metoda utilizată: test cu tuburi de fermentație

Durata testului	Substanța martor				Substanța de testat		
	Proba martor DOC (1) mg/l	DOC (1) mg/l	DOC net mg/l	Degradare %	DOC (1) mg/l	DOC net mg/l	Degradare %
0	-	-	300,0	-	-	390,0	-
3 ore	4,0	298,0	294,0	2,0	371,6	367,6	6
1 zi	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 zile	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 zile	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 zile	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 zile	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 zile	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 zile	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 zile	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Valori medii ale determinărilor efectuate de trei ori.

Figura 1

Exemple de curbe de biodegrabilitate

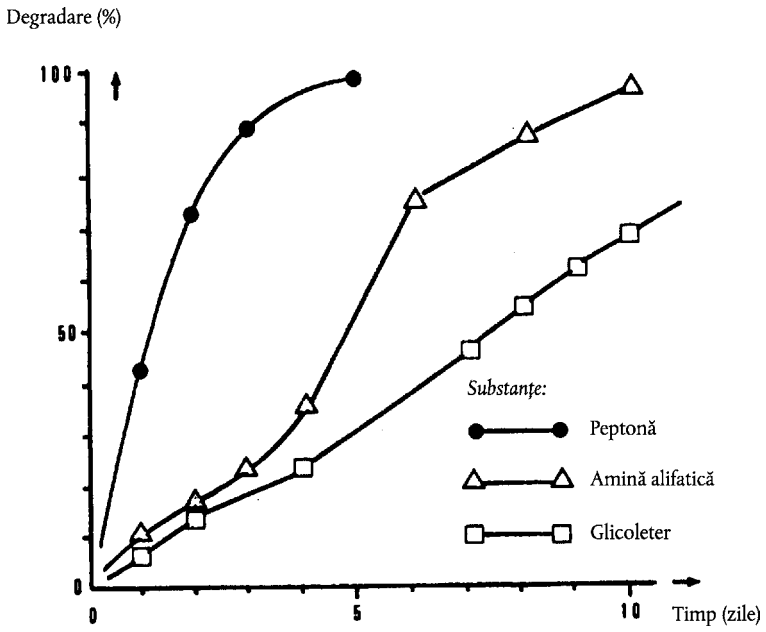
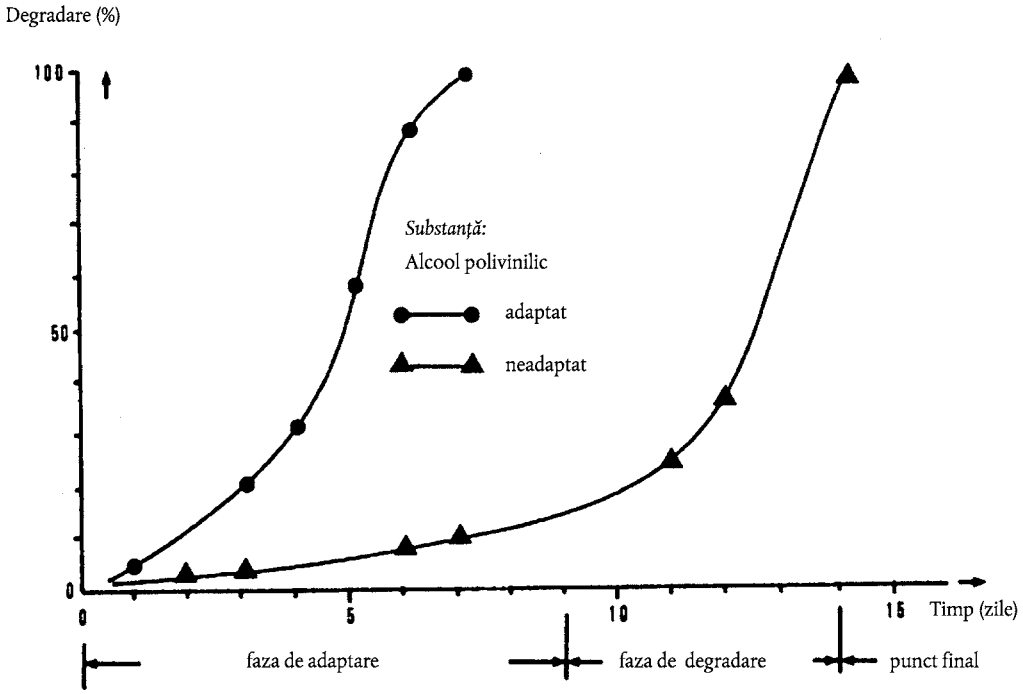


Figura 2

Exemple de adaptare a nămolului



BIODEGRADARE

TESTE DE SIMULARE CU NĂMOL ACTIV

1. **METODĂ**

1.1. **Introducere**

1.1.1. *Observații generale*

Această metodă se aplică numai pentru acele substanțe organice care, la concentrația folosită la testare:

— sunt solubile în apă la nivelul necesar pentru pregătirea soluțiilor testate;

— au presiunea vaporilor neglijabilă în condițiile de testare;

— nu sunt inhibitoare pentru bacterii.

Informațiile cu privire la proporțiile relative ale principalelor componente ale compusului de testat se utilizează la interpretarea rezultatelor obținute, în special în cazurile în care rezultatele indică valori scăzute sau marginale.

Informațiile cu privire la toxicitatea substanței asupra microorganismelor se folosesc pentru interpretarea rezultatelor cu valori scăzute și pentru alegerea unor concentrații adecvate de testare.

1.1.2. *Determinarea biodegradabilității totale (analiza COD/CCO)*

Scopul metodei este de a determina biodegradabilitatea totală prin măsurarea eliminării substanței și a tuturor metaboliților dintr-un model de instalație de tratare a nămolului activ pornind de la o concentrație inițială care corespunzătoare a > 12 mg COD/l (sau aproximativ 40 mg CCO/l); 20 mg COD/l se pare că este concentrația optimă. (COD = carbon organic dizolvat; CCO = consum chimic de oxigen).

Trebuie stabilit conținutul de carbon organic (sau consumul chimic de oxigen) al substanței de testat.

1.1.3. *Determinarea biodegradabilității primare (analize specifice)*

Scopul metodei este determinarea biodegradabilității primare a unei substanțe într-un model de instalație de tratare a nămolui activ în concentrație de aproximativ 20 mg/l, printr-o metodă analitică specifică (se pot folosi concentrații mai mari sau mai mici dacă metoda analitică și limitele de toxicitate permit acest lucru). Acest lucru permite evaluarea biodegradabilității primare a substanței (dispariția structurii chimice inițiale).

Scopul acestei metode *nu* este determinarea mineralizării substanței de testat.

Trebuie să fie disponibilă o metodă analitică corespunzătoare pentru determinarea substanței de testat.

1.2. **Definiții și unități**

1.2.1. *Analiza COD/CCO*

Gradul de eliminare al substanței este dat de:

$$DR = \frac{T - (E - E_o)}{T} \times 100\ \% \qquad [1(a)]$$

unde:

DR = gradul de eliminare în procente de COD (sau CCO) în cadrul timpului mediu de retenție dat, față de substanța de testat;

T = concentrația substanței de testat în influentul instalației, în mg COD/l sau (mg CCO/l);

E = concentrația COD (sau CCO) în efluentul instalației de testare, în mg COD/l sau (mg CCO/l);

E_0 = concentrația COD (sau CCO) în efluentul instalației martor, în mg COD/l sau (mg CCO/l).

Degradarea se exprimă ca procent de eliminare COD (sau CCO) în timpul de retenție dat, față de substanța de testat.

1.2.2. *Analiza specifică*

Procentul de eliminare a substanței de testat din faza apoasă (R_W) în timpul mediu de retenție dat se calculează cu ajutorul formulei:

$$R_W = \frac{C_I - C_O}{C_I} \times 100\ \% \qquad [1(b)]$$

unde:

C_1 = concentrația substanței în influentul instalației de testare (mg de substanță/l determinată prin analize specifice);

C_O = concentrația substanței în efluentul instalației de testare (mg de substanță/l determinată prin analize specifice).

1.3. **Substanțe de referință**

În anumite cazuri, când se studiază o substanță nouă, substanțele de referință pot fi utile; cu toate acestea, nu se pot recomanda încă substanțe de referință specifice.

1.4. **Principiul metodelor de testare**

Pentru determinarea biodegradabilității totale se folosesc în paralel două instalații pilot de tratare a nămolului activ (testul de confirmare OCDE sau instalații de tip vas poros). Substanța de testat se adaugă în influentul (ape uzată sintetică sau menajeră) uneia dintre instalații, în timp ce cealaltă este alimentată numai cu apă uzată. Pentru determinarea biodegradabilității primare prin analize specifice ale influentului și efluentului, se folosește numai o instalație de testare.

Se măsoară concentrațiile COD (sau CCO) în efluenți sau se determină concentrațiile substanței prin analize specifice.

COD datorat substanței de testat nu se măsoară, ci doar se menționează.

În cazul în care se fac măsurători COD (sau CCO), se presupune că diferența dintre concentrațiile medii ale efluenților testați și efluenților martor se datorează substanței de testat nedegradate.

În cazul în care se fac analize specifice, se poate măsura modificarea concentrației moleculei de bază (biodegradare primară).

Aceste instalații pot funcționa în „regim cu instalații cuplate", printr-o metodă de transinoculare.

1.5. **Criterii de calitate**

Concentrația inițială a substanței depinde de tipul și de limitele analizelor efectuate.

1.6. **Descrierea metodei de testare**

1.6.1. *Pregătire*

1.6.1.1. Aparatură

Sunt necesare două instalații de același tip, excepție făcând cazurile în care se efectuează analize specifice. Se pot folosi două tipuri de dispozitive:

Testul de confirmare OCDE

Echipamentul (Apendicele 1) constă dintr-un vas de alimentare (A) pentru apa uzată sintetică, pompă dozatoare (B), vas de aerare (C), vas de decantare (D), pompă cu aer comprimat (E) pentru recircularea nămolului activ și vas colector (F) pentru efluentul tratat.

Vasele (A) și (F) trebuie să fie din sticlă sau din material plastic adecvat, cu un volum util de cel puțin 24 litri. Pompa (B) trebuie să asigure un debit constant de apelor uzate sintetice în vasul de aerare; se poate folosi orice sistem corespunzător, cu condiția ca debitul de intrare și concentrația să fie asigurate. În timpul funcționării normale, nivelul vasului de decantare (D) este fixat astfel încât volumul din vasul de aerare să fie de trei litri de soluție amestecată. Un sistem de aerare din material sinterizat (G) este suspendat în vasul (C) la vârful conului. Cantitatea de aer suflată prin aerator poate fi monitorizată cu ajutorul unui debitmetru.

Pompa cu aer comprimat (E) se reglează astfel încât nămolul activ din vasul de decantare să fie recirculat continuu și cu regularitate în vasul de aerare (C).

„Vas poros"

Vasul poros este construit din folii de polietilenă poroase (2 mm grosime, dimensiunea maximă a porilor 95 µm) sub formă de cilindri cu diametru de 14 cm cu bază conică la 45° (figurile 1 și 2 din apendicele 2). Vasul poros se așază într-un recipient impermeabil din material plastic, cu diametrul de 15 cm cu un orificiu la înălțimea de 17,2 cm pe partea cilindrică, care determină capacitatea vasului (3 litri). În partea de sus a vasului poros se găsește un inel de sprijin rigid, realizat din material plastic, care lasă un spațiu pentru efluent de 0,5 cm între vasul interior și cel exterior.

Vasele poroase pot fi montate la baza unei băi de apă cu control termostatic. La baza vasului poros există un flux de aer pe care se plasează difuzorii corespunzători.

Recipientele (A) și (E) trebuie să fie din sticlă sau material plastic adecvat și să aibă un volum util de cel puțin 24 litri. Pompa (B) trebuie să asigure un debit constant al apei uzate sintetice în vasul de aerare; se poate folosi orice sistem convenabil, cu condiția asigurării debitului de alimentare și a concentrației.

Sunt necesare vase poroase de rezervă, pentru a le înlocui pe cele care se blochează în timpul funcționării; vasele blocate se curăță prin imersare timp de 24 ore în soluție de hipoclorit, apoi se spală cu apă de la robinet.

1.6.1.2. Filtrarea

Aparatul de filtrare cu membrană și membrane de filtrare cu dimensiunea porilor de 0,45 µm. Membranele de filtrare se pot folosi dacă este sigur că ele nu evacuează carbon și nici nu adsorb substanța în faza de filtrare.

1.6.1.3. Apa uzată

Se poate folosi fie un efluent sintetic, fie apă uzată menajeră.

Exemplu de efluent sintetic

Dizolvați pentru fiecare litru de apă de la robinet:

Peptonă:	160 mg,
Extract de carne:	110 mg,
Uree:	30 mg,
NaCl:	7 mg,
$CaCl_2.2H_2O$:	4 mg,
$MgSO_2.7H_2O$:	2 mg,
K_2HPO_4:	28 mg.

Apă uzată menajeră

Aceasta se colectează proaspătă în fiecare zi, de la preaplinul vasului de decantare primară al instalației de tratare a apei uzate menajere.

1.6.1.4. Soluția mamă a substanței de testat

Se prepară o soluție a substanței de testat, de exemplu 1 %, care se adăugă în instalația de testare. Se determină concentrația substanței, astfel încât să se calculeze volumul corect care urmează să se adauge în apa uzată sau direct în instalație printr-o a doua pompă, astfel încât să se obțină concentrația de testare necesară.

1.6.1.5. Inoculul

Observație: Dacă se folosește apă uzată menajeră, nu are nici un sens să se folosească un inocul cu concentrație bacteriană scăzută, dar se poate folosi nămol activ.

Se pot folosi mai multe tipuri de inocul.

Se dau trei exemple de inocul adecvat:

(a) Inocul pe bază de efluent secundar

Inoculul trebuie obținut dintr-un efluent secundar de bună calitate prelevat de la o instalație de tratare alimentată preponderent cu apă uzată menajeră. Efluentul trebuie menținut în condiții aerobe în perioada dintre prelevarea probei și folosirea ei. Pentru prepararea inoculului, proba se filtrează printr-un filtru cu porozitate mare, primii 200 ml eliminându-se. Filtratul se păstrează în condiții aerobe până la utilizare. Inoculul trebuie folosit în ziua prelevării pentru inoculare, se folosesc cel puțin 3 ml;

(b) Inocul compus

Inocul provenit de la efluentul secundar:

A se vedea descrierea de mai sus.

Inocul pe bază de pământ:

Se pun în suspensie 100 g de sol de grădină (fertil, nu steril) în 1 000 ml apă potabilă fără clor. (Solurile cu o cantitate extrem de mare de argilă, nisip sau humus nu sunt adecvate). După agitare, suspensia se lasă să se decanteze timp de 30 minute. Supernatantul se filtrează printr-o hârtie de filtru cu porozitate mare, primii 200 ml eliminându-se. Filtratul se păstrează în condiții aerobe până la utilizare. Inoculul trebuie folosit în ziua prelevării.

Inocul pe bază de apă de suprafață.:

Se prelevează un inocul dintr-o apă de suprafață mezosaprobă. Proba se filtrează printr-o hârtie de filtru cu porozitate mare, primii 200 ml eliminându-se. Filtratul se păstrează în condiții aerobe până la utilizare. Inoculul trebuie folosit în ziua prelevării.

Se amestecă cu grijă volume egale din cele trei tipuri de eșantioane de inoculi definiți anterior, astfel încât din acest amestec să se obțină inoculul final. Pentru inoculare, se folosesc cel puțin 3 ml;

(c) Inocul pe bază de nămol activ

Ca inocul se poate folosi un volum (nu mai mare de 3 l) de nămol activ (conținutul de materii solide în suspensie este de până la 2,5 g/l) prelevat din vasul de aerare al unei instalații în care se tratează cu preponderență apă uzată menajeră.

1.6.2. *Mod de operare*

Testul se realizează la temperatura incintei; aceasta trebuie menținută între 18 și 25 °C.

Dacă este necesar, testul se poate realiza la o temperatură mai joasă (până la 10 °C); dacă substanța este degradată, nu mai este necesară nici o altă acțiune. Cu toate acestea, dacă substanța nu este degradată, testul trebuie efectuat la o temperatură constantă de 18 – 25 °C.

1.6.2.1. Perioada de pornire: formarea nămolului/stabilizarea instalațiilor

Perioada de formare a nămolului/stabilizare este perioada în care concentrația de materii solide în suspensie din nămolul activ și performanțele instalațiilor cresc până se atinge un regim constant în condițiile de funcționare dorite.

Perioada de pornire este perioada care durează din momentul în care se adaugă prima dată substanța de testat până în momentul în care curba valorilor de îndepărtare a acesteia se stabilizează (se ajunge la o valoare relativ constantă). Această perioadă nu trebuie să depășească șase săptămâni.

Perioada de evaluare este o perioadă de trei săptămâni, care începe în momentul în care îndepărtarea substanței de testat ajunge la o valoare relativ constantă și, de regulă, mare. Pentru substanțele care prezintă o degradare redusă sau nici o degradare în primele șase săptămâni, perioada de evaluare este considerată ca fiind următoarele trei săptămâni.

La început, instalațiile se alimentează cu cantitatea de inocul amestecat cu influent necesar pentru un singur test.

Dispozitivul de aerare [și pompa cu aer comprimat (E), în cazul instalațiilor pentru testul de confirmare OCDE] și pompa dozatoare (B) sunt puse apoi în funcțiune.

Influentul fără substanța de testat trebuie să treacă prin vasul de aerare (C) fie cu viteza de 1 l/h, fie cu viteza de ½ l/h; acest lucru dă un timp de retenție mediu de trei sau șase ore.

Viteza de aerare trebuie reglată astfel încât conținutul vasului de aerare (C) să fie menținut constant în suspensie, în timp ce conținutul de oxigen dizolvat să fie de cel puțin 2 mg/l.

Trebuie evitată spumarea cu mijloace adecvate. Nu trebuie folosiți agenți antispumare care inhibă nămolul activ.

Nămolul care s-a acumulat în partea de sus a vasului de aerare (C) [iar în cazul instalațiilor pentru testul de confirmare OCDE, la baza vasului de decantare (D) și în circuit] trebuie să fie recirculat în soluția amestecată cel puțin o dată pe zi, prin periere sau alte mijloace convenabile.

Dacă nămolul nu se decantează, densitatea acestuia se poate crește în mod repetat, de câte ori este nevoie, prin adăugarea a 2 ml de soluție de 5 % clorură ferică.

Efluentul se colectează în vasul (E) sau (F) timp de 20 - 24 ore și se prelevează o probă după amestecare. Vasul (E) sau (F) trebuie să fie curățat cu grijă.

Pentru a se monitoriza și controla eficiența procesului, consumul chimic de oxigen (CCO) sau carbonul organic dizolvat (COD) din filtratul de efluent acumulat, precum și cel din filtratul de influent se măsoară cel puțin de 2 ori pe săptămână [folosind o membrană cu dimensiunea porilor de 0,45 μm, primii (aproximativ) 20 ml eliminându-se].

Scăderea CCO sau COD se stabilizează atunci când se obține o degradare zilnică aproape uniformă.

Conținutul de substanță uscată al nămolului activ din vasul de aerare trebuie determinat de două ori pe săptămână (în g/l). Instalațiile pot funcționa în unul din următoarele două moduri: fie conținutul de substanță uscată din nămolul activ trebuie determinat de două ori pe săptămână, iar dacă este mai mare de 2,5 g/l, nămolul activ în exces trebuie eliminat; fie 500 ml de soluție amestecată se elimină zilnic din fiecare vas pentru a da un timp mediu de retenție a nămolului de 6 zile.

Când parametrii măsurați și estimați [eficiența procesului (în înlăturarea CCO sau COD), concentrația de nămol, capacitatea de sedimentare a nămolului, turbiditatea efluenților etc.] ai celor două instalații sunt suficient de stabili, substanța de testat se poate introduce în influentul uneia dintre instalații în conformitate cu punctul 1.6.2.2.

Alternativ, substanța de testat se poate adăuga la începutul perioadei de formare a nămolului (1.6.2.1), în special atunci când nămolul se adaugă ca inocul.

1.6.2.2. Mod de operare

Se mențin condițiile de funcționare din perioada de pornire și se adaugă suficientă soluție mamă (aproximativ 1 %) de substanță de testat în influentul instalației de testare, astfel încât să se obțină concentrația dorită de substanță de testat (aproximativ 10 – 20 mg COD/l sau 40 mg CCO/l) în apa uzată. Aceasta se poate obține prin amestecarea soluției mamă cu apă uzată zilnic sau cu ajutorul unui sistem de pompare separat. Această concentrație poate fi atinsă progresiv. Dacă nu există efecte toxice ale substanței de testat asupra nămolului activ, se pot testa concentrații mai mari.

Instalația martor se alimentează cu influent fără adaos de substanțe. Se iau pentru analiză volume adecvate de efluenți și se filtrează prin filtrele cu membrană (0,45 µm), iar primii 20 ml (aproximativ) de filtrat se elimină.

Probele filtrate trebuie analizate în aceeași zi, altfel acestea trebuie conservate prin orice metodă convenabilă, folosindu-se, de exemplu, 0,05 ml soluție de clorură de mercur 1 % ($HgCl_2$) la fiecare 10 ml de filtrat sau prin depozitarea lor la 2 – 4 °C timp de 24 ore sau sub -18 °C pe perioade mai îndelungate.

Perioada de pornire, cu adăugarea substanței de testat, nu trebuie să depășească șase săptămâni, iar perioada de evaluare nu trebuie să fie mai scurtă de trei săptămâni, pentru calcularea rezultatului final fiind recomandabil să fie disponibile aproximativ 14 – 20 de determinări.

Regimul cu instalații cuplate

Cuplarea instalațiilor se realizează prin schimbul reciproc de 1,5 l de soluție amestecată (inclusiv nămol) din vasele de aerare a nămolului activ între cele două instalații, o dată pe zi. În cazul substanțelor de testat puternic absorbante, se scot 1,5 l numai de supernatant din vasele de decantare și se toarnă în vasul cu nămol activ al celeilalte instalații.

1.6.2.3. Analiza

Se efectuează 2 tipuri de analize pentru a urmări comportamentul substanței:

COD și CCO

Se determină concentrațiile CCO de două ori cu analizorul de carbon și/sau valorile CCO, conform trimiterii (2).

Analiza specifică

Concentrațiile substanței de testat se determină printr-o metodă analitică corespunzătoare. Dacă este posibil, se determină substanța absorbită de nămol.

2. DATE ȘI EVALUARE

2.1. Cuplarea instalațiilor

Când se folosește „regimul cu instalații cuplate”, gradele zilnice de eliminare (DR) se calculează în conformitate cu punctul 1.2.1.

Aceste grade zilnice de eliminare DR se corectează la DRc pentru transferul de soluție datorită metodei de transinoculare cu ecuația [2] pentru un timp de retenție mediu de trei ore și cu ecuația [3] pentru un timp de retenție mediu de șase ore.

$$DRc = \frac{8}{7}DR - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$DRc = \frac{4}{3}DR - \frac{100}{3} \quad [3]$$

Se calculează media seriilor valorilor DR_C și, de asemenea, deviația standard conform ecuației [4]

$$s_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(\overline{DRc} - DRc_i\right)^2}{n-1}} \quad [4]$$

unde:

s_{DRc} = deviația standard a seriilor valorilor DR_c

$\overline{DRc}$ = media valorilor DR_c

n = numărul de determinări

Valorile excepționale ale seriilor DR_c se elimină prin metode statistice adecvate, de exemplu Nalimov (6), la nivelul de probabilitate de 95 %, și se recalculează media și deviația standard a setului de date DR_c fără valorile excepționale.

Rezultatul final se calculează apoi cu ecuația [5] ca:

$$DRc = \overline{DRc} \pm \frac{t_{n-1};\alpha}{\sqrt{n}} s_{DRc} \quad [5]$$

unde:

$t_{n-1};\alpha$ = valoarea din tabel a lui t pentru n perechi de valori E și Eo și încrederea statistică P (P = 1 – α), unde P reprezintă 95 % (1).

Rezultatul este exprimat ca medie cu limite de toleranță la nivelul de probabilitate de 95 %, cu deviația standard respectivă și numărul de date din setul DR_C fără valori excepționale, precum și numărul de valori excepționale, de exemplu:

DR_c = 98,6 ± 2,3 % eliminare COD

s = 4,65 % eliminare COD

n = 18,

x = numărul de valori excepționale.

2.2. **Regimul cu instalații necuplate**

Performanța instalațiilor se poate verifica după cum urmează:

$$\%\ \text{eliminare CCO sau DOC} = \frac{\text{CCO sau COD din apa uzată} - \text{CCO sau COD din efluent}}{\text{CCO sau COD din apa uzată}} \times 100$$

Aceste eliminări zilnice se pot reprezenta grafic pentru a reliefa orice tendință, de exemplu la aclimatizare.

2.2.1. *Folosirea determinărilor CCO/COD*

Gradul zilnic de eliminare a DR se calculează conform 1.2.1.

Se calculează media seriei de valori DR; în plus, se calculează deviația standard conform:

$$s_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(\overline{DR} - DR_i\right)^2}{n-1}} \quad [6]$$

unde:

s_{DR} deviația standard a seriilor de valori DR_i

$\overline{DR}$ media valorilor DR_i

n număr de determinări

Valorile excepționale din seriile DR se elimină conform metodei statistice corespunzătoare, de exemplu Nalimov (6), la nivelul de probabilitate de 95 %, și se recalculează media și deviația standard a setului de date DR fără valorile excepționale.

Rezultatul final este calculat apoi cu ecuația [7] ca:

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1};\alpha}{\sqrt{n}} s_{DR} \qquad [7]$$

unde:

$t_{n-1};\alpha$ = valoarea din tabel a lui t pentru n perechi de valori ale lui E și E_o și încrederea statistică P (P = 1 – α), unde P reprezintă 95 % (1).

Rezultatul este exprimat ca medie cu limite de toleranță la nivel de probabilitate de 95 %, deviația standard respectivă și numărul de date din setul DR fără valori excepționale, precum și numărul de valori excepționale, de exemplu:

DR = (98,6 ± 2,3) % eliminare COD,

s = 4,65 % eliminare COD,

n = 18,

x = numărul de valori excepționale.

2.2.2. *Folosirea analizei specifice*

Procentul de eliminare a substanței de testat din faza apoasă (R_W) se calculează în conformitate cu punctul 1.2.2.

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— formularul din apendicele 3, indicând condițiile de funcționare pentru testului;

— aparatul ales (testul de confirmare OCDE sau vasul poros);

— modul de funcționare ales: instalații cuplate sau nu;

— tipul apei uzate: sintetică sau menajeră - în cazul apei uzate menajere data și locul prelevării;

— inoculul cu data și locul prelevării;

— menționarea și descrierea metodei analitice, dacă se fac analize specifice;

— reprezentarea grafică a eliminării CCO sau COD în funcție de timp, inclusiv perioada de pornire și de evaluare;

— determinarea analitică a substanței de testat ca CCO sau COD din soluția mamă;

— dacă s-au făcut analize specifice, reprezentarea grafică a procentului de eliminare a substanței de testat din faza apoasă în funcție de timp (perioada de pornire și de evaluare);

— media eliminării COD sau CCO din substanța de testat și deviația standard se calculează din rezultatele perioadei de evaluare, dacă există o eliminare constantă a substanței de testat sau o perioadă de funcționare în regim constant;

— reprezentarea grafică a concentrației de nămol activ în funcție de timp;

— eventualele observații privind nămolul activ (eliminarea nămolului în exces, prezența unor aglomerate, $FeCl_3$ etc.);

— concentrația substanței de testat;

— toate rezultatele privind analizele efectuate asupra nămolului;

— toate informațiile și rezultatele experimentale privind substanța de testat și substanța de referință, dacă s-a utilizat;

— argumente științifice pentru toate schimbările ale modului de operare.

3.2. **Interpretarea rezultatelor**

Un grad scăzut de îndepărtare a substanței de testat din faza apoasă se poate datora faptului că substanța inhibă microorganismele. Acest lucru se poate observa prin lizã și pierdere de nămol, rezultând un supernatant tulbure, și prin scăderea eficienței eliminării CCO (sau COD) din instalația pilot.

Adsorbția fizico-chimică poate să joace uneori un rol. Diferențele între acțiunea biologică asupra moleculei și adsorbția fizico-chimică se pot observa prin analizele efectuate pe nămol după o desorbție adecvată.

Dacă trebuie să se facă o distincție între biodegradare (sau biodegradare parțială) și adsorbție, sunt necesare teste suplimentare.

Aceasta se poate face în mai multe moduri, cel mai convingător fiind utilizarea supernatantului ca inocul într-un test din setul de bază (de preferință testul respirometric).

Dacă se observă eliminări mari ale COD sau CCO, aceasta se datorează biodegradării, în timp ce la eliminările reduse biodegradarea nu se distinge de eliminare. De exemplu, dacă un compus solubil prezintă o constantă de adsorbție ridicată, de 98 %, iar rata de pierdere a surplusului de nămol este de 10 % pe zi, este posibilă o eliminare de până la 40 %; la o rată de pierdere a surplusului de nămol de 30 %, eliminarea datorată adsorbției pe nămol și eliminării surplusului poate ajunge la 65 % (4).

În cazul în care se folosesc analize specifice, trebuie să se acorde atenție relației dintre structura substanței și analizele specifice folosite. În acest caz, fenomenul observat nu poate fi interpretat ca o mineralizare a substanței.

4. **REFERINȚE [TF2]**

(1) OECD, Paris, 1981, *Linii directoare privind testele 303 A*, Decizia Consiliului C(81) 30 final.

(2) Anexa V, C.9. *Test de degradare – consum chimic de oxigen*. Directiva Comisiei 84/449/CEE, *Jurnalul Oficial al Comunităților Europene*, nr. L 251, 19. 9. 1984.

(3) Painter, H.A., King, ESTE.F., *WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability*, Technical Report TR70, June 1978, Water Research Centre, United Kingdom.

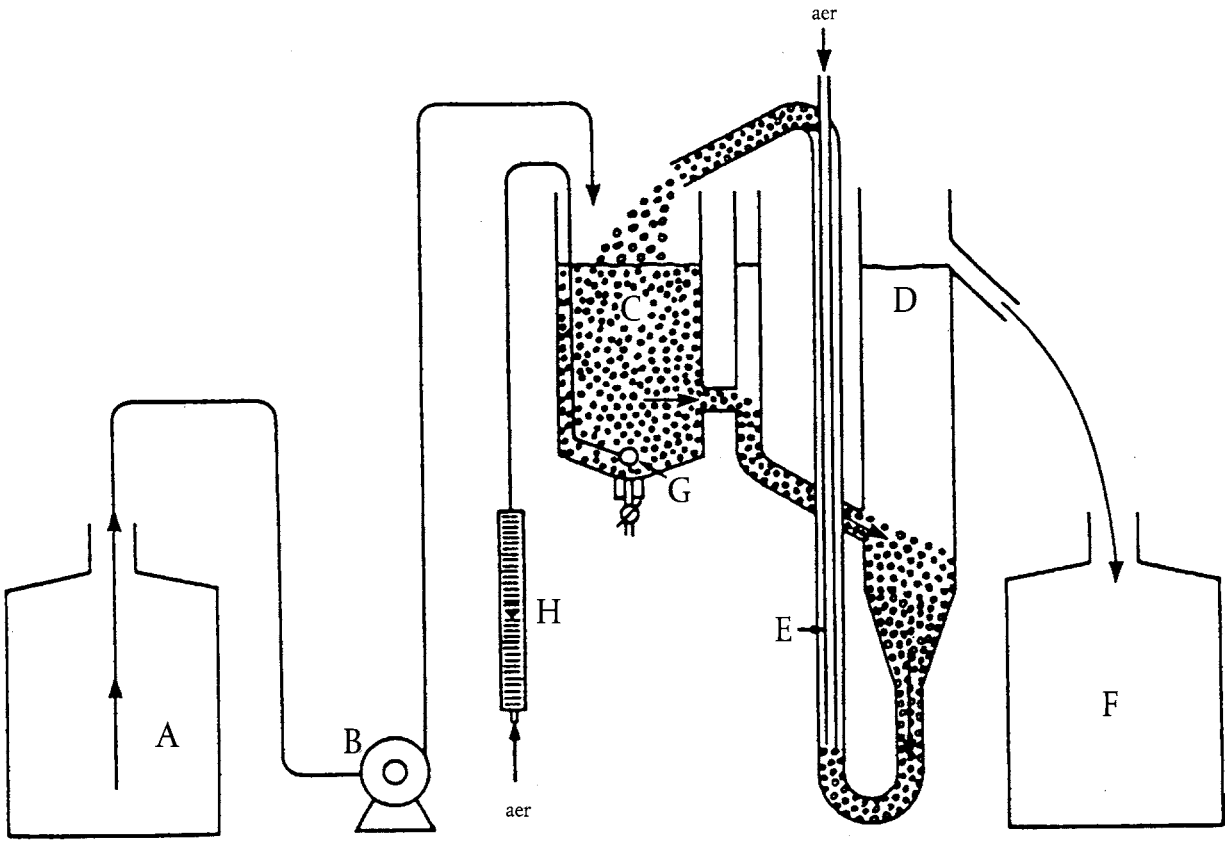
(4) Wierich, P., Gerike, P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated sludge plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 5, No 2, June 1981, pp. 161 to 171.

(5) Directivele 82/242/CEE și 82/243/CEE ale Consiliului, Jurnalul Oficial al Comunităților Europene, nr.L 109, 22.4.1982, de modificare a Directivelor 73/404/CEE și 73/405/CEE privind biodegradabilitatea detergenților, nr. L 347, 17. 12.1973.

(6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreißertests, insbesondere bei Ringsversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fresenius-Zeitschrift für Analytische Chemie*, 303 (1980), pp. 406 - 408.

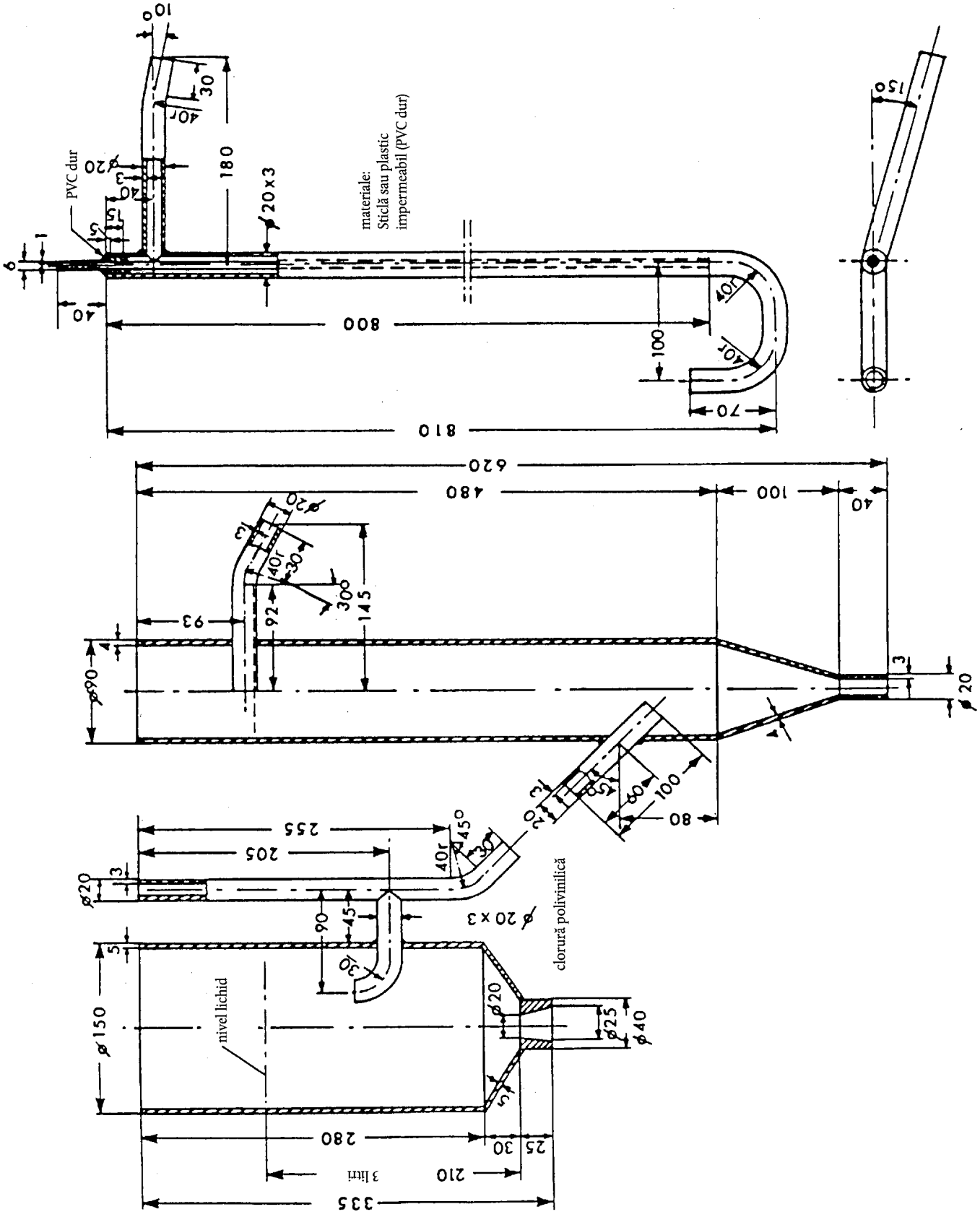
Apendicele 1

Figura 1



Legendă: A = vas de alimentare;
B = pompă dozatoare;
C = vas de aerare (3 l);
D = vas de decantare;
E = pompă cu aer comprimat;
F = vas colector al efluentului;
G = dispozitiv de aerare;
H = debitmetru de aer (opțional)

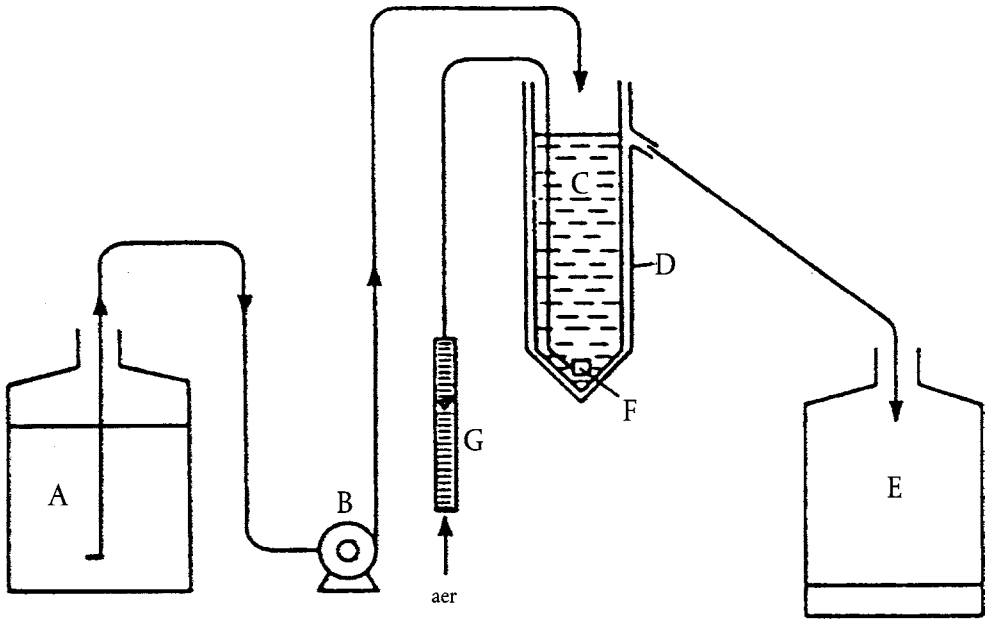
Figura 2


materiale:
Sticlă sau plastic
impermeabil (PVC dur)
PVC dur
clorură polivinilică
nivel lichid
3 litri

Apendicele 2

Figura 1

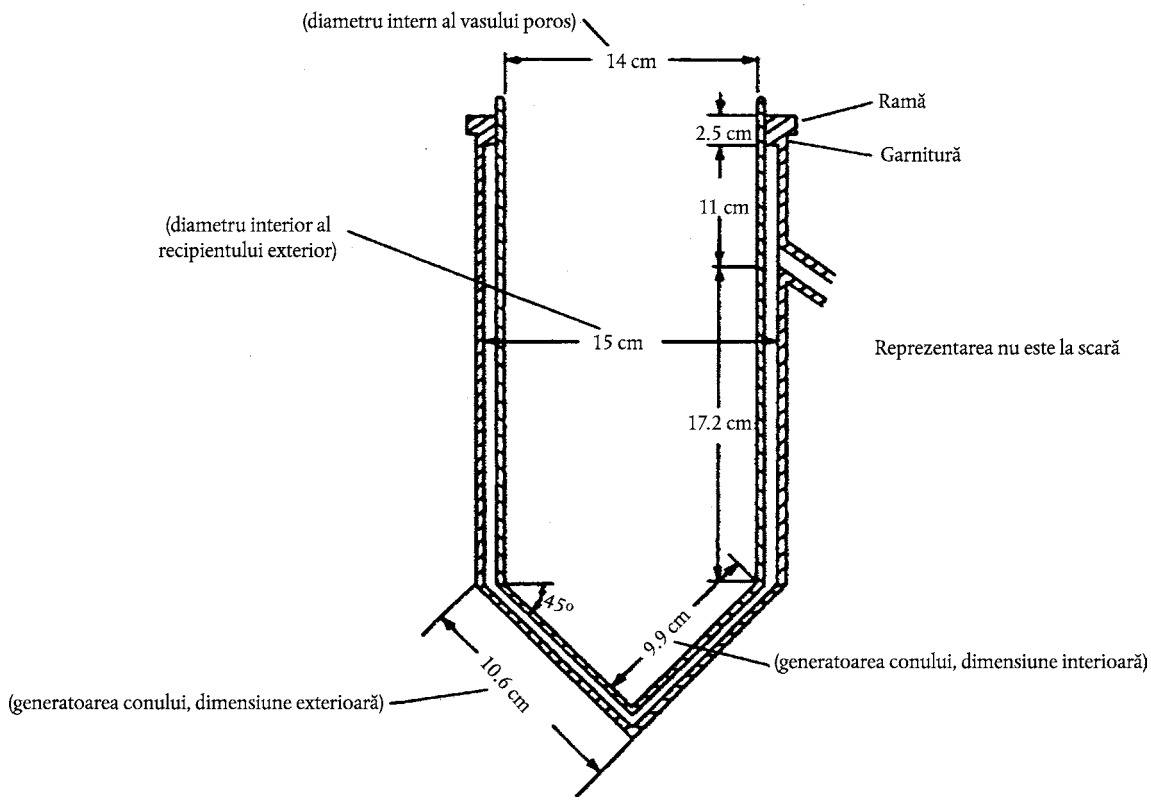
Echipament utilizat pentru evaluarea biodegradabilității



Legendă: A = vas de alimentare;
B = pompă dozatoare;
C = vas poros de aerare;
D = recipient exterior impermeabil;
E = vas colector al efluentului;
F = dispozitiv de aerare cu difuzor;
G = rotametru (opțional)

Figura 2

Detalii ale vasului poros de aerare de 3 l



Apendicele 3

Condiții de funcționare pentru testul de simulare pe nămol activ

A se verifica în fiecare grupă

Aparatură

Testul de confirmare OCDE ☐

Vas poros ☐

Mod de funcționare

Instalație individuală ☐

Instalații cuplate ☐

Instalații necuplate ☐

Transinoculare

Fără ☐

Nămol activ ☐

Supernatant ☐

Timpul de retenție mediu

3 ore ☐

6 ore ☐

Substanță nutritivă de bază

Apă uzată menajeră ☐

Apă uzată sintetică ☐

Inocul

Efluent secundar ☐

Compozit ☐

Nămol activ ☐

Adăugare de substanță de testat

De la început ☐

Creștere treptată ☐

După formarea nămolului ☐

Analize

Specifică ☐

CCO ☐

COD ☐

BIODEGRADARE

NĂMOL ACTIV: TEST DE INHIBIȚIE A RESPIRAȚIEI

1. METODĂ

1.1. Introducere

Metoda descrisă evaluează efectul substanței de testat asupra microorganismelor măsurând rata respirației în condiții definite, în prezența unor concentrații diferite ale substanței de testat.

Scopul acestei metode este de a asigura o metodă de selecție rapidă prin care să se poată identifica substanțele care afectează negativ instalațiile de tratare microbiană aerobă și să se facă estimări asupra unor concentrații convenabile, neinhibitoare, ale substanțelor folosite în testele de biodegradabilitate.

Testul definitiv poate fi precedat de un test preliminar. Acesta poate oferi informații cu privire la intervalul de concentrații folosite în testul principal.

Testul este conceput astfel încât să cuprindă doi martori fără substanță testată, unul la începutul iar celălalt la sfârșitul seriei de teste. Fiecare lot de nămol activ trebuie apoi verificat cu o substanță de referință.

Această metodă se aplică substanțelor care, datorită solubilității în apă și volatilității reduse, pot să rămână în apă.

Pentru substanțele cu solubilitate limitată în mediul de testare nu se poate determina CE_{50}.

Rezultatele bazate pe absorbția de oxigen pot conduce la concluzii eronate atunci când substanța de testat are tendința de a întrerupe lanțul metabolic de fosforilare oxidativă.

Pentru efectuarea testului sunt utile următoarele informații:

— solubilitatea în apă;

— presiunea vaporilor;

— formula structurală;

— puritatea substanței de testat.

Recomandare

Nămolul activ poate conține organisme potențial patogene și trebuie manipulat cu atenție.

1.2. Definiții și unități

Rata respirației reprezintă consumul de oxigen al microorganismelor din apa uzată aflate în nămol aerob, exprimată, în general, ca mg O_2 pe mg de nămol pe oră.

Pentru a calcula efectul inhibitor al substanței de testat la o anumită concentrație, rata respirației se exprimă ca procent din media celor două rate-martor:

$$\left(1-\frac{2R_s}{Rc_1+Rc_2}\right)\times 100 = \text{ procent inhibiție}$$

unde:

R_s = debitul consumului de oxigen la concentrația testată a substanței de testat;

R_{C1} = debitul consumului de oxigen, martorul 1;

R_{C2} = debitul consumului de oxigen, martorul 2;

CE_{50} reprezintă în prezenta metodă concentrația substanței de testat la care rata respirației este de 50 % din cea rezultată în proba martor, în condițiile descrise în prezenta metodă.

1.3. **Substanțe de referință**

Se recomandă ca 3,5-diclorfenolul, cunoscut ca inhibitor al respirației, să fie folosit ca substanță de referință și să fie testat pentru CE_{50} pe fiecare lot de nămol activ, ca mijloc de verificare a faptului că sensibilitatea nămolului nu este anormală.

1.4. **Principiul metodei de testare**

Se măsoară rata respirației nămolului activ alimentat cu o cantitate standard de apă uzată sintetică, după un timp de contact de 30 minute sau trei ore sau ambele. Se măsoară și rata respirației aceluiași nămol activ în prezența diferitelor concentrații ale substanței de testat, toate celelalte condiții fiind identice. Efectul inhibitor al substanței de testat la o anumită concentrație se exprimă ca procent față de media celor două rate ale respirației din cei doi martori. Valoarea CE_{50} se calculează din determinări la diferite concentrații.

1.5. **Criterii de calitate**

Rezultatele testului sunt validate dacă:

— ratele de respirație în cei doi martori diferă în limita a 15 % una față de alta;

— CE_{50} (30 minute și/sau trei ore) a 3,5 - diclorfenolului se găsește în intervalul acceptat de 5 –30 mg/l.

1.6. **Descrierea metodei de testare**

1.6.1. *Reactivi*

1.6.1.1. **Soluțiile substanței de testat**

Se prepară soluții proaspete ale substanțelor testare la începutul studiului, folosindu-se o soluție mamă. Dacă se urmează metoda recomandată mai jos, concentrația adecvată a soluției mamă este de 0,5 g/l.

1.6.1.2. **Soluția substanței martor**

De exemplu, se poate pregăti o soluție de 3,5-diclorofenol astfel: se dizolvă 0,5 g de 3,5-diclorofenol în 10 ml NaOH 1M, se adaugă aproximativ 30 ml apă distilată, se adăugă sub agitare H_2SO_4 0,5M până în punctul precipitării incipiente (vor fi necesari aproximativ 8 ml de H_2SO_4 0,5M) și, în final, se aduce amestecul la 1 l, folosind apă distilată. PH-ul trebuie să fie între 7 și 8.

1.6.1.3. **Apă reziduală sintetică**

Se prepară un efluent sintetic prin dizolvarea următoarelor cantități de substanțe într-un litru de apă:

— 16 g peptonă;

— 11 g extract de carne;

— 3 g uree;

— 0,7 g NaCl;

— 0,4 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$;

— 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$;

— 2,8 g K_2HPO_4.

Nota 1: Această apă uzată sintetică este de 100 de ori mai concentrată decât cea descrisă în raportul tehnic al OCDE „Metodă propusă pentru determinarea biodegradabilității agenților tensioactivi folosiți la detergenții sintetici" (11 iunie 1976) cu adăugarea fosfatului acid de potasiu.

Nota 2: Dacă mediul preparat nu se folosește imediat, trebuie păstrat la întuneric la 0 – 4 °C, nu mai mult de o săptămână, în condiții care nu produc nici o schimbare în compoziția sa. Mediul poate fi și sterilizat înainte de depozitare sau peptona și extractul de carne se pot adăuga imediat înainte de începerea testului. Înainte de utilizare, mediul se agită bine și se ajustează pH-ul.

1.6.2. *Aparatura*

Aparate de măsurare: nu este important ca aparatul să aibă o formă precisă. Cu toate acestea, nu trebuie să rămână spațiu liber în recipientul de măsurare plin, iar electrodul trebuie să adere perfect la gâtul acestuia.

Sunt necesare echipamente de laborator normale și în special următoarele:

— aparatură de măsurare;

— dispozitiv de aerare;

— electrod de pH și aparatură adecvată pentru măsurarea pH-ului;

— electrod de oxigen.

1.6.3. *Pregătirea inoculului*

Se folosește nămol activ dintr-o instalație de tratare a apelor uzate preponderent menajere, ca inocul microbian pentru testare.

Dacă este necesar, la revenirea în laborator, particulele mari se pot înlătura prin sedimentare după o scurtă perioadă de timp, de exemplu 15 minute, iar stratul superior de materii solide fine poate fi decantat pentru utilizare. Alternativ, nămolul poate fi agitat folosind un amestecător timp de câteva secunde.

În plus, dacă se consideră că sunt prezente substanțe inhibitoare, nămolul trebuie spălat cu apă de la robinet sau cu o soluție izotonică. După centrifugare, se decantează supernatantul (acest procedeu se repetă de 3 ori).

O cantitate mică de nămol este cântărită și uscată. Pornind de la acest rezultat, se poate calcula cantitatea de nămol umed cu care se realizează suspensia apoasă așa încât să se obțină o soluție de nămol activ cu un conținut de materii solide în suspensie între 2 – 4 g/l. Acest nivel dă o concentrație între 0,8 și 1,6 g/l în mediul de testare dacă se urmează metoda recomandată mai jos.

Dacă nămolul nu poate fi folosit în ziua prelevării, se adaugă 50 ml apă uzată sintetică la fiecare litru de nămol activ pregătit conform descrierii de mai sus; acesta este apoi aerat peste noapte la 20 ± 2 °C. În continuare este păstrat în condiții de aerare în vederea utilizării în timpul zilei. Înainte de utilizare, se verifică și se ajustează pH-ul, dacă este necesar, la pH 6 – 8. Materiile solide în suspensie din soluția amestecată se determină după metoda descrisă în paragraful anterior.

Dacă este necesar ca același lot de nămol să fie folosit în zilele următoare (maxim patru zile), se adaugă 50 ml de apă uzată sintetică la 1 litru de nămol, la sfârșitul fiecărei zile de lucru.

1.6.4. *Desfășurarea testului*

Durată/timp de contact:	30 de minute și/sau trei ore, cu aerare
Apă:	Apă potabilă (declorinată, dacă este necesar)
Alimentare cu aer:	Aer curat, fără uleiuri. Debit de aer de la 0,5 la 1 litru/minut
Aparat de măsurare:	Pahar de laborator cu fund plat, cum ar fi pahar de tip CBO (consum biochimic de oxigen)
Oxigenometru:	Electrod de oxigen adecvat, cu înregistrare
Soluție nutritivă:	Apă uzată sintetică (a se vedea mai sus)
Substanță de testat:	Soluția de testare se prepară imediat înainte de începerea testului
Substanță de referință:	de ex. 3,5-diclorfenol (la cel puțin trei concentrații)
Martori:	Mostră inoculată fără substanță de testat
Temperatură:	20 ± 2 °C

O metodă experimentală, care poate fi urmată atât pentru test cât și pentru substanța de referință, pe o perioadă de contact de trei ore, este prezentată mai jos:

Se folosesc câteva vase (de exemplu, pahare de laborator de 1 l).

Trebuie folosite cel puțin 5 concentrații într-o serie geometrică, cu un raport care este de preferat să nu depășească 3,2.

La momentul „0”, se aduc 16 ml apă de efluent sintetic care se completează până la 300 ml cu apă. Se adaugă 200 ml de inocul microbian, iar amestecul total (500 ml) se toarnă într-un prim vas (prima probă martor C_1).

Vasele de testare trebuie aerate în permanență pentru ca O_2 dizolvat să nu scadă sub 2,5 mg/litru și pentru ca, imediat înainte de măsurarea ratei respirației, concentrația de O_2 să fie de aproximativ 6,5 mg/litru.

La momentul „15 minute" (15 minute este un interval arbitrar, dar convenabil) procedeul de mai sus se repetă, exceptând faptul că se adaugă 100 ml din soluția mamă de substanță de testat la 16 ml apă uzată sintetică înainte de a se adăuga apă până la 300 ml și inocul microbian, pentru a obține un volum de 500 ml. Acest amestec se toarnă apoi în al doilea vas și se aerează conform metodei de mai sus. Acest procedeu se repetă la intervale de 15 minute, cu adăugare de volume diferite de soluție mamă pentru a obține o serie de recipiente ce conțin concentrații diferite ale substanței de testat. În final, se pregătește un al doilea martor (C_2).

După trei ore, se înregistrează pH-ul, iar la o probă bine amestecată din conținutul primului vas se măsoară rata respirației pe o perioadă de până la 10 minute.

Această determinare se repetă pentru conținutul fiecărui recipient la intervale de 15 minute, astfel încât timpul de contact în fiecare vas să fie de trei ore.

Substanța de referință se testează pe fiecare lot de inocul microbian în același mod.

Va fi necesar un regim diferit (de exemplu, mai mult de un oxigenometru) dacă măsurătorile trebuie să se facă după 30 minute de contact.

Dacă este necesară măsurarea consumului chimic de oxigen, se pregătesc alte recipiente ce conțin substanță de testat, efluent sintetic și apă, dar nu și nămol activ. Se măsoară consumul de oxigen și se înregistrează după un timp de aerare de 30 minute și/sau trei ore (timp de contact).

2. DATE ȘI EVALUARE

Rata respirației se calculează după înregistrările cuprinse între aproximativ 6,5 mg O_2/l și 2,5 mg O_2/l sau pe o perioadă de 10 minute, dacă viteza respirației este redusă. Porțiunea curbei de respirație pe care se măsoară ratei respirației trebuie să fie liniară.

Dacă ratele respirației la cele două probe martor diferă cu mai mult de 15 % sau CE_{50} a substanței de referință (la 30 minute și/sau trei ore) nu se găsește în intervalul acceptat (5-30 mg/l pentru 3,5-diclorfenol), testul este invalidat și trebuie repetat.

Procentul de inhibiție se calculează la fiecare concentrație de testare (a se vedea punctul 1.2). Procentul de inhibiție se reprezintă grafic în raport cu concentrația, pe hârtie lognormală (sau de logaritmică probit) și se obține valoarea CE_{50}.

Limita de încredere de 95 % pentru valorile CE_{50} se poate determina folosindu-se metode standard.

3. RAPORT

3.1. Raportul de testare

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— substanța de testat: datele de identificare chimică;

— sistemul de testare: sursa, concentrația și orice pretratare a nămolului activ;

— condiții de testare:

  — pH-ul amestecului de reacție înainte de măsurarea respirației;

  — temperatura de testare;

  — durata testului;

  — substanța de referință și CE_{50} măsurat;

  — absorbția abiotică de oxigen (după caz);

— rezultate:

  — toate datele măsurate;

  — curba de inhibiție și metoda de calcul al CE_{50};

  — CE_{50} și, dacă este posibil, la limita de încredere 95 %, CE_{20} și CE_{30},

  — toate observațiile și abaterile de la această metodă care ar putea influența rezultatul.

3.2. Interpretarea datelor

Valoarea CE_{50} trebuie considerată doar ca un indiciu al toxicității probabile a substanței de testat asupra nămolului activ utilizat la tratarea apei uzate sau asupra microorganismelor din apa uzată, deoarece interacțiunile complexe care au loc în mediu nu pot fi simulate precis în testul de laborator. De asemenea, substanțele de testat care pot avea un efect inhibitor asupra oxidării amoniacului pot produce și curbe de inhibiție atipice. De aceea, aceste curbe trebuie interpretate cu atenție.

4. **REFERINȚE**

(1) International Standard ISO 8192-1986.

(2) Broecker, B., Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, p. 165.

(3) Brown, D., Hitz, H.R., Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, p. 245.

(4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method No 103*, descrisă și de:

(5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, p. 80.

(6) Schefer, w., *Textilveredlung* 6, 1977, p. 247.

(7) OCDE, Paris, 1981, *Linii directoare privind testele 209*, Decizia Consiliului C (81) 30 final.

BIODEGRADARE

TEST SCAS MODIFICAT

1. **METODA**

1.1. **Introducere**

Scopul metodei este evaluarea biodegradabilității totale potențiale a substanțelor organice nevolatile și solubile în apă, când sunt expuse la concentrații relativ mari de microorganisme pe o perioadă lungă de timp. Viabilitatea microorganismelor se menține pe această perioadă prin aport zilnic de apă uzată decantată (pentru condițiile de sfârșit de săptămână, apa poate fi păstrată la 4 °C. Alternativ, se poate folosi apa uzată sintetică din testul de confirmare OCDE).

Poate avea loc adsorbția fizico-chimică pe materiile solide în suspensie, acest lucru trebuind luat în considerare la interpretarea rezultatelor (a se vedea 3.2.).

Datorită perioadei de păstrare îndelungată a fazei apoase (36 de ore) și adăugării intermitente a substanțelor nutritive, testul nu simulează condițiile din mediul natural în stația de epurare a apei uzate. Rezultatele obținute cu diferite substanțe de testat arată că testul are un potențial mare de evaluare a biodegradabilității.

Condițiile prevăzute de test sunt extrem de favorabile selecției și/sau adaptării microorganismelor capabile să degradeze compusul de testare. (Procedura poate fi folosită și pentru a produce inoculi aclimatizați pentru utilizare în alte teste).

În această metodă, măsurarea concentrației carbonului organic dizolvat se folosește pentru a evalua biodegradabilitatea totală a substanțelor de testat. Este preferabil să se determine COD după acidificare și purjare, nu ca diferență între $C_{total} - C_{anorganic}$.

Utilizarea simultană a metodei analitice specifice poate permite evaluarea biodegradării primare a substanței (dispariția structurii chimice inițiale).

Metoda se aplică numai pentru substanțele organice care, la concentrația folosită în test:

— sunt solubile în apă (cel puțin 20 mg carbon organic dizolvat/litru);

— au presiunea vaporilor neglijabilă;

— nu sunt inhibitoare pentru bacterii;

— nu se adsorb semnificativ în sistemul de testare;

— nu se pierd prin spumare din soluția testată.

Trebuie stabilit conținutul de carbon organic al compusului testat.

Informațiile despre proporțiile relative ale principalelor componente ale substanței de testat se utilizează la interpretarea rezultatelor obținute, în special în cazurile în care rezultatele indică valori scăzute sau marginale.

Informațiile despre toxicitatea substanței de testat asupra microorganismelor se folosesc pentru interpretarea rezultatelor cu valori scăzute și pentru alegerea unor concentrații adecvate de testare.

1.2. **Definiții și unități**

C_T = concentrația substanței de testat, exprimată în carbon organic prezent sau adăugat în apa uzată decantată la începutul perioadei de aerare (mg/l);

C_t = concentrația de carbon organic dizolvat determinată în supernatantul soluției testate la sfârșitul perioadei de aerare (mg/l);

C_c = concentrația de carbon organic dizolvat determinată în supernatantul soluției de control la sfârșitul perioadei de aerare (mg/l).

Biodegradarea se definește în această metodă ca fiind dispariția carbonului organic. Biodegradarea poate fi exprimată ca:

1. Procentul de eliminare D_{da} al cantității de substanță adăugată zilnic.

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \quad [1]$$

unde D_{da} = degradare/adaos zilnic.

2. Procentul de eliminare D_{ssd} a cantității de substanță prezente la începutul fiecărei zile:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2\ (a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2\ (b)]$$

unde D_{asd} = degradare/substanță la începutul zilei;

indicii i și (i + 1) se referă la ziua măsurării.

Se recomandă ecuația 2(a) dacă COD al efluentului variază de la zi la zi, în timp ce ecuația 2(b) se poate folosi când COD al efluentului rămâne relativ constant de la zi la zi.

1.3. **Substanțe de referință**

În unele cazuri, când se studiază o substanță nouă, pot fi utile substanțele de referință; cu toate acestea, nu se recomandă aici nici o substanță de referință specifică.

Datele despre mai mulți compuși evaluați în testele de comparație interlaboratoare (a se vedea apendicele 1) se prezintă în principal pentru a permite calibrarea periodică a acestei metode și compararea rezultatelor dacă se folosește altă metodă.

1.4. **Principiul metodei de testare**

Nămolul activ din instalația de tratare a apei uzate se introduce într-o instalație de tratare cu nămol activ cu alimentare semicontinuă (SCAS). Se adaugă substanța de testat și apa uzată menajeră decantată, iar amestecul se aerează 23 de ore. Aerarea este apoi oprită, nămolul se lasă să se decanteze și se elimină supernatantul.

Nămolul care rămâne în vasul de aerare se amestecă apoi cu o parte din substanța de testat și de apă uzată, iar ciclul se repetă.

Biodegradarea se evaluează prin determinarea conținutului de carbon organic dizolvat în soluția de supernatant. Valoarea obținută se compară cu cea găsită pentru soluția dintr-un tub martor alimentat numai cu apă uzată decantată.

Dacă se folosește o metodă analitică specifică, se pot măsura schimbările din concentrația moleculei inițiale care se datorează biodegradării (biodegradabilitate primară).

1.5. **Criterii de calitate**

Nu s-a stabilit încă reproductibilitatea prezentei metode bazate pe eliminarea carbonului organic dizolvat. (Dacă se ia în considerare biodegradarea primară, se obțin date foarte exacte pentru substanțele care sunt foarte degradate).

Sensibilitatea acestei metode este determinată în mare parte de variabilitatea probei martor și într-o mai mică măsură de precizia determinării carbonului organic dizolvat și de nivelul substanței de testat în soluție la începutul fiecărui ciclu.

1.6. **Descrierea metodei de testare**

1.6.1. *Pregătire*

Se folosește un număr suficient de unități de aerare curate, alternativ cu unitatea originală de testare SCAS de 1,5 l și se montează tuburile de intrare a aerului (figura 1) pentru fiecare substanță testată și proba martor. Aerul comprimat care pătrunde în unitățile de testare, purificat printr-un filtru de vată hidrofilă, nu trebuie să conțină carbon organic și să fie deja saturat cu apă pentru a se reduce pierderile prin evaporare.

Se prelevează o probă de soluție mixtă ce conține 1 – 4 g materii solide în suspensie pe litru din stația de epurare a apei uzate cu nămol activ. Sunt necesari aproximativ 150 ml de soluție omogenă pentru fiecare instalație de aerare.

Soluțiile mamă se prepară cu apă distilată; în mod normal, concentrația necesară este de 400 mg/l exprimată în carbon organic, ceea ce dă o concentrație a substanței de testat de 20 mg/l carbon la începutul fiecărui ciclu de aerare, dacă nu se produce nici o biodegradare.

Sunt acceptabile concentrații mai mari dacă toxicitatea față de microorganisme permite acest lucru.

Se măsoară conținutul în carbon organic al soluțiilor mamă.

1.6.2. *Condiții experimentale*

Testul trebuie realizat la 20-25 °C.

Se folosește o concentrație mare de microorganisme aerobe (1 – 4 g/l materii solide în suspensie), iar perioada de păstrare efectivă este de 36 ore. Carbonul organic din efluentul uzat este, în mod normal, oxidat puternic după 8 ore după începerea fiecărui ciclu de aerare. Apoi, nămolul respiră endogen în perioada rămasă de aerare, timp în care singurul substrat disponibil este substanța de testat, dacă aceasta nu se metabolizează ușor. Aceste caracteristici, combinate cu reinocularea zilnică a soluției de testat, dacă se folosește apă de uzată menajeră ca mediu, oferă condiții favorabile atât pentru aclimatizare, cât și pentru o biodegradare rapidă.

1.6.3. *Realizarea testului*

Se prelevează o probă de soluție omogenă din instalația de epurare a apei predominant menajere cu nămol activ sau dintr-o unitate de laborator și se păstrează în condiții aerobe până la folosirea în laborator. Fiecare unitate de aerare, precum și unitatea martor, se umple cu 150 ml de soluție omogenă (dacă se folosește unitatea de testare originală SCAS, volumele date se înmulțesc cu 10) și începe aerarea. După 23 de ore aerarea se oprește, iar nămolul se lasă să se decanteze timp de 45 de minute. Se deschide pe rând robinetul fiecărui recipient și se extrag 100 ml din supernatant. Se prelevează o probă de apă uzată menajeră decantată, imediat înainte de utilizare, și se adaugă 100 ml la nămolul rămas în fiecare unitate de aerare. Aerarea se pornește din nou. În această fază nu se adaugă nici o substanță de testat, iar unitățile se alimentează zilnic cu apă uzată menajeră până când la decantare se obține un supernatant limpede. De obicei, aceasta poate să dureze 2 săptămâni, timp în care carbonul organic dizolvat în supernatant, la sfârșitul fiecărui ciclu de aerare, se apropie de o valoare constantă.

La sfârșitul acestei perioade, nămolurile decantate individual se amestecă și se adaugă în fiecare unitate câte 50 ml din nămolul compozit rezultat.

În unitățile martor se adaugă 95 ml apă uzată decantată și 5 ml de apă, iar în unitățile de testare se adaugă 95 ml de apă uzată decantată și 5 ml de soluție mamă a substanței de testat corespunzătoare (400 mg/l). Aerarea începe din nou și continuă 23 de ore. Nămolul se lasă să se decanteze 45 minute, se scoate supernatantul și se analizează conținutul de carbon organic dizolvat.

Procedeul de mai sus, de umplere și scoatere, se repetă zilnic, pe toată perioada testului.

Înainte de decantare, poate fi necesară curățarea pereților unităților pentru a preveni acumularea de materii solide peste nivelul lichidului. Se folosește o racletă sau o perie pentru fiecare unitate, pentru a preveni contaminarea.

Ideal este să se determine zilnic conținutul de carbon organic dizolvat în supernatant. Înainte de analiză, soluțiile se filtrează prin filtre cu membrană de 0,45 µm, se spală sau se centrifughează. Filtrele cu membrană sunt acceptabile dacă se asigură că nu are loc nici eliminare de carbon, nici absorbție de substanță în faza de filtrare. Temperatura probei nu trebuie să depășească 40 °C când aceasta este în centrifugă.

Durata testului pentru substanțele care prezintă biodegradare scăzută sau nulă este nedeterminată, dar experiența arată că aceasta trebuie să fie de cel puțin 12 săptămâni, în general, dar nu mai mult de 26 săptămâni.

2. **DATE ȘI EVALUARE**

Valorile masei de carbon organic dizolvat în soluțiile de supernatant din unitățile de testare și din unitățile martor sunt reprezentate grafic în funcție de timp.

Pe măsură ce se realizează biodegradarea, nivelul constatat la testare se apropie de cel din proba martor. Când se constată că diferența dintre cele două niveluri este constantă la trei măsurări consecutive, se efectuează un număr suficient de măsurări suplimentare, pentru a permite interpretarea statistică a datelor și calcularea procentului de biodegradare al substanței de testat (D_{da} sau D_{ssd}, a se vedea punctul 1.2).

3. **RAPORT**

3.1. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— toate informațiile despre tipul de apă uzată, tipul de unități folosite și rezultatele experimentale privind substanța de testat, substanța de referință (dacă s-a folosit) și proba martor;

— temperatura;

— curba de eliminare cu descriere și mod de calcul (a se vedea 1.2);

— data și locul unde au fost prelevate probele de nămol activ și apă uzată, starea adaptării, concentrația etc.;

— argumentele științifice pentru eventualele modificări ale metodei de testare;

— semnătura și data.

3.2. **Interpretarea rezultatelor**

Deoarece substanța care urmează să fie testată prin această metodă nu este ușor biodegradabilă, orice eliminare a COD datorată numai biodegradării este în mod normal treptată, în zile sau săptămâni, cu excepția cazurilor în care aclimatizarea este bruscă, așa cum indică dispariția bruscă care se petrece după câteva săptămâni.

Cu toate acestea, adsorbția fizico-chimică poate juca uneori un rol important; acesta se manifestă prin eliminarea completă sau parțială a COD-ului adăugat de la început. Ceea ce se întâmplă ulterior depinde de factori cum ar fi gradul de absorbție și concentrația materiilor solide în suspensie în efluentul eliminat. De obicei, diferența dintre concentrația COD în soluția martor și în supernatantul de testare crește treptat de la valoarea inițială redusă, această diferență rămânând apoi la noua valoare în restul experimentului, dacă nu are loc aclimatizarea.

Dacă trebuie să se facă o distincție între biodegradare (sau biodegradare parțială) și adsorbție, sunt necesare teste ulterioare. În acest scop există mai multe metode, cea mai convingătoare fiind utilizarea supernatantului sau a nămolului ca inocul într-un test din setul de bază (de preferință un test respirometric).

Substanțele de testat care dau valori mari de eliminare de COD neadsorbit în acest test trebuie considerate ca posibil biodegradabile. Eliminarea parțială neadsorbtivă arată că substanța chimică este supusă cel puțin unei biodegradări parțiale.

Eliminările reduse sau nule ale COD se pot datora inhibării microorganismelor de către substanța de testat și acest lucru poate fi dovedit prin lizăși pierderea nămolului, rezultând supernatanți tulburi. Testul trebuie repetat folosindu-se o concentrație mai scăzută de substanță testată.

Utilizarea unei metode analitice specifice sau a unei substanțe de testat marcate cu ^{14}C permite o sensibilitate mai mare. În cazul substanței de testat cu ^{14}C, recuperarea $^{14}CO_2$ va confirma că biodegradarea s-a produs.

În cazul în care rezultatele sunt exprimate în termeni de biodegradare primară, este necesar să se dea, în măsura în care este posibil, explicații cu privire la modificare a structurii chimice care duce la pierderea răspunsului substanței de testat inițiale.

Validarea metodei analitice trebuie însoțită de rezultatul obținut în mediul testului martor.

4. **REFERINȚE**

(1) OECD, Paris, 1981, *Linii directoare privind testele 302 A*, Decizia Consiliului C(81) 30 final.

Apendicele 1

Test SCAS: Exemple de rezultate

Substanță	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Procent de biodegradare D_{da}	Durata testului (zile)
4-acetil aminobenzen sulfonat	17,2	2,0	85	40
Tetra-propilen benzen sulfonat	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Dietilen glicol	16,5	0,2	98,8	40
Anilină	16,9	1,7	95,9	40
Ciclopentan tetra carboxilat	17,9	3,2	81,1	120

Apendicele 2

Exemplu de aparatură de testare

Figura 1

