

II

(Acte fără caracter legislativ)

REGULAMENTE

REGULAMENTUL (UE) 2017/735 AL COMISIEI

din 14 februarie 2017

de modificare, în scopul adaptării la progresul tehnic, a anexei la Regulamentul (CE) nr. 440/2008 de stabilire a metodelor de testare în temeiul Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH)

(Text cu relevanță pentru SEE)

COMISIA EUROPEANĂ,

având în vedere Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene,

având în vedere Regulamentul (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului din 18 decembrie 2006 privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH), de înființare a Agenției Europene pentru Produse Chimice, de modificare a Directivei 1999/45/CE și de abrogare a Regulamentului (CEE) nr. 793/93 al Consiliului și a Regulamentului (CE) nr. 1488/94 al Comisiei, precum și a Directivei 76/769/CEE a Consiliului și a Directivelor 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE ale Comisiei și a Directivei 2000/21/CE a Comisiei ⁽¹⁾, în special articolul 13 alineatul (2),

întrucât:

- (1) Regulamentul (CE) nr. 440/2008 al Comisiei ⁽²⁾ conține metodele de testare care se aplică pentru determinarea proprietăților fizico-chimice, a toxicității și a ecotoxicității substanțelor chimice, în scopurile Regulamentului (CE) nr. 1907/2006.
- (2) Este necesară actualizarea Regulamentului (CE) nr. 440/2008 pentru a include metode de testare noi și actualizate adoptate recent de Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică (OCDE) pentru a ține cont de progresul tehnic și pentru a asigura reducerea numărului de animale utilizate în scopuri experimentale, în conformitate cu Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului ⁽³⁾. Părțile interesate au fost consultate cu privire la acest proiect.
- (3) Adaptarea la progresul tehnic cuprinde douăzeci de metode de testare: o metodă de testare nouă pentru determinarea unei proprietăți fizico-chimice, cinci metode de testare noi și una actualizată pentru evaluarea ecotoxicității, două metode de testare actualizate pentru evaluarea evoluției și a comportamentului în mediu, precum și patru metode de testare noi și șapte actualizate pentru determinarea efectelor asupra sănătății umane.
- (4) OCDE își revizuieste în mod regulat orientările privind testarea pentru identificarea celor care sunt caduce din punct de vedere științific. Prezenta adaptare la progresul tehnic elimină șase metode de testare pentru care orientările corespunzătoare privind testarea ale OCDE au fost anulate.

⁽¹⁾ JO L 396, 30.12.2006, p. 1.

⁽²⁾ Regulamentul (CE) nr. 440/2008 al Comisiei din 30 mai 2008 de stabilire a metodelor de testare în temeiul Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH) (JO L 142, 31.5.2008, p. 1).

⁽³⁾ Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice (JO L 276, 20.10.2010, p. 33).

- (5) Prin urmare, Regulamentul (CE) nr. 440/2008 ar trebui să fie modificat în consecință.
- (6) Măsurile prevăzute în prezentul regulament sunt conforme cu avizul comitetului înființat în temeiul articolului 133 din Regulamentul (CE) nr. 1907/2006,

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

Articolul 1

Anexa la Regulamentul (CE) nr. 440/2008 se modifică în conformitate cu anexa la prezentul regulament.

Articolul 2

Prezentul regulament intră în vigoare în a douăzecea zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene*.

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

Adoptat la Bruxelles, 14 februarie 2017.

Pentru Comisie
Președintele
Jean-Claude JUNKER

ANEXĂ

Anexa la Regulamentul (CE) nr. 440/2008 se modifică după cum urmează:

(1) În partea A, se adaugă următorul capitol:

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

INTRODUCERE

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea nr. 112 (1981).

Premise

- Metodă analitică adecvată
- Solubilitate în apă

Informații orientative

- Formulă structurală
- Conductivitate electrică pentru metoda conductometrică

Declarații eligibile

- Toate metodele de testare pot fi efectuate pe substanțe pure sau la calitate din comerț. Se iau în considerare eventualele efectele ale impurităților asupra rezultatelor.
- Metoda de titrare nu este potrivită pentru substanțe cu solubilitate scăzută (a se vedea soluțiile de testare de mai jos).
- Metoda spectrofotometrică se aplică numai la substanțele care au spectre de absorbție UV/VIS diferite în mod semnificativ pentru formele disociate și nedisociate. Această metodă poate fi adecvată, de asemenea, pentru substanțele cu solubilitate scăzută și pentru disocieri non-acid/bază, de exemplu formarea de complexi.
- În cazul în care se aplică ecuația Onsager, metoda conductometrică poate fi utilizată inclusiv la concentrații relativ scăzute și chiar în cazurile de echilibre non-acid/bază.

Documente standard

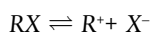
Această metodă de testare se bazează pe metode indicate în referințele enumerate în secțiunea „Referințe bibliografice” și în documentul Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification EPA, 18 august 1978.

METODA – INTRODUCERE, SCOP, DOMENIU DE APLICARE, RELEVANȚĂ, APLICARE ȘI LIMITE ALE TESTĂRII

Disocierea unei substanțe în apă este importantă pentru evaluarea impactului acesteia asupra mediului. Aceasta condiționează forma substanței care, la rândul său, determină comportamentul și transportul acesteia. Aceasta poate afecta adsorbția substanței chimice pe soluri și sedimente și absorbția în celule biologice.

Definiții și unități

Disocierea este divizarea reversibilă în două sau mai multe specii chimice care pot fi ionice. Procesul este indicat în general prin



iar constanta de echilibru a concentrației care reglementează reacția este

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

De exemplu, în cazul special în care R este hidrogen (substanța este un acid), constanta este

$$K_a = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

sau

$$pK_a = pH - \log \frac{[X^-]}{[HX]}$$

Substanțe de referință

Următoarele substanțe de referință nu este necesar să fie folosite în toate cazurile în care se studiază o substanță nouă. Acestea sunt furnizate, în principal, pentru a permite calibrarea periodică a metodei și pentru a oferi posibilitatea comparării rezultatelor atunci când se aplică o altă metodă.

	pK_a ⁽¹⁾	Temp. în °C
P-nitrofenol	7,15	25 ⁽¹⁾
Acid benzoic	4,12	20
p-Cloranilină	3,93	20

⁽¹⁾ Valoarea pentru 20 °C nu este disponibilă, dar se poate presupune că variabilitatea rezultatelor măsurării este mai mare decât dependența de temperatură preconizată

Ar fi util să se dispună de o substanță cu mai multe pK astfel cum se indică în secțiunea „Principiul metodei” de mai jos. O astfel de substanță ar putea fi:

Acid citric	pK_a (8)	Temp. în °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Principiul metodei de testare

Procesul chimic descris este în general doar în mică măsură dependent de temperatură, în intervalul de temperatură relevant din punct de vedere al mediului. Determinarea constantei de disociere necesită o măsură a concentrațiilor formelor disociate și nedisociate ale substanței chimice. Pe baza cunoștințelor privind stoichiometria reacției de disociere indicate mai sus în secțiunea „Definiții și unități”, poate fi determinată constanta adecvată. În cazul specific descris în prezenta metodă de testare, substanța se comportă ca un acid sau ca o bază, iar determinarea se efectuează cel mai convenabil prin stabilirea concentrațiilor relative ale formelor ionizate și neionizate ale substanței și a pH-ului soluției. Relația dintre acești termeni este redată în ecuația pentru pK_a în secțiunea „Definiții și unități” de mai sus. Unele substanțe prezintă mai mult de o constantă de disociere și ecuații similare pot fi dezvoltate. Unele dintre metodele descrise în prezenta anexă sunt adecvate, de asemenea, pentru disocierea non-acidă/bază.

Criterii de calitate

Repetabilitate

Constanta de disociere se reproduce (cel puțin trei determinări) cu o precizie de $\pm 0,1$ unități logaritmice.

DESCRIEREA PROCEDURILOR DE TESTARE

Există două abordări principale pentru determinarea pK_a -ului. Una dintre acestea implică titrarea unei cantități cunoscute de substanță cu un acid sau o bază standard, după caz; cealaltă implică determinarea concentrației relative a formelor ionizate și neionizate și a dependenței acestora de pH.

Preparate

Metodele bazate pe principiile menționate pot fi clasificate ca proceduri de titrare, spectrofotometrice și conductometrice.

Soluții de testare

Pentru metoda de titrare și metoda conductometrică, substanța chimică se dizolvă în apă distilată. Pentru metoda spectrofotometrică și pentru alte metode, sunt utilizate soluții tampon. Concentrația substanței testate nu trebuie să depășească cea mai mică valoare dintre 0,01 M sau jumătate din concentrația de saturare, iar pentru crearea soluțiilor se utilizează cea mai pură formă disponibilă de substanță. În cazul în care substanța este greu solubilă, aceasta se poate dizolva într-o cantitate mică de solvent miscibil în apă înainte de a se adăuga la concentrațiile indicate mai sus.

Soluțiile se verifică pentru a detecta prezența emulsiilor cu ajutorul unui fascicul Tyndall, în special în cazul în care a fost utilizat un cosolvent pentru a crește solubilitatea. În cazul în care sunt utilizate soluții tampon, concentrația tampon nu trebuie să depășească 0,05 M.

Condițiile de testare

Temperatura

Temperatura se controlează la cel puțin ± 1 °C. Determinarea se efectuează de preferință la 20 °C.

În cazul în care se suspectează o dependență semnificativă de temperatură, determinarea se efectuează la cel puțin două alte temperaturi. În acest caz, intervalele de temperatură trebuie să fie de 10 °C, iar controlul temperaturii, de $\pm 0,1$ °C.

Analize

Metoda va fi determinată de natura substanței testate. Aceasta trebuie să fie suficient de sensibilă pentru a permite determinarea diferitelor tipuri la fiecare concentrație de soluție testată.

Desfășurarea testării

Metoda de titrare

Soluția de testat se determină prin titrare cu o soluție standard bazică sau acidă, după caz, măsurând pH-ul după fiecare adăugare de soluție de titrare. Cel puțin 10 adăugări suplimentare trebuie efectuate până la punctul de echivalență. În cazul în care echilibrul este atins suficient de rapid, se poate utiliza un potențiomtru cu înregistrare. Pentru această metodă, atât cantitatea totală de substanță, cât și concentrația acestora trebuie să fie cunoscute cu exactitate. Trebuie luate măsuri de precauție pentru a exclude dioxidul de carbon. Detaliile procedurii, măsurile de precauție, precum și metodele de calcul sunt prezentate în testări standard, de exemplu referințele bibliografice (1), (2), (3), (4).

Metoda spectrofotometrică

O lungime de undă este constatată în cazul în care formele ionizate și neionizate ale substanței au coeficienți de extincție diferiți în mod considerabil. Spectrul de absorbție UV/VIS se obține din soluții de concentrație constantă într-o condiție de pH în care substanța este în esență neionizată și pe deplin ionizată și la mai multe valori intermediare ale pH-ului. Acest lucru poate fi realizat fie prin adăugarea de acid concentrat (bază) la un volum relativ mare de soluție a substanței într-o soluție tampon cu mai multe componente, inițial cu valoare ridicată (scăzută) a pH-ului (referința 5) sau prin adăugarea de volume egale dintr-o soluție mamă de substanță în, de exemplu, apă, metanol, la volume constante de diferite soluții tampon care acoperă intervalul de pH dorit. Din valorile pH-ului și cele de absorbție la lungimea de undă aleasă, este calculat un număr suficient de valori de pK_a utilizând datele pentru minim 5 pH-uri în care substanța este ionizată cel puțin 10 procente și cel mult 90 de procente. Detalii experimentale suplimentare și metoda de calcul sunt prezentate în referința (1).

Metoda conductometrică

Utilizând o celulă cu o constantă celulară mică, cunoscută, se măsoară nivelul de conductivitate al unei soluții de aproximativ 0,1 M de substanță de testat în apă de conductibilitate. De asemenea, se măsoară conductivitățile unei serii de diluții ale acestei soluții efectuate cu acuratețe. Concentrația este redusă la jumătate de fiecare dată, iar seria trebuie să acopere cel puțin un ordin de mărime al concentrației. Conductivitatea limită la diluție infinită se calculează prin efectuarea unui experiment similar cu sarea Na și prin extrapolare. Gradul de disociere poate fi calculat ulterior din conductivitatea fiecărei soluții cu ajutorul ecuației Onsager, prin urmare, utilizând legea diluției lui Ostwald, constanta de disociere poate fi calculată drept $K = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$, unde C este concentrația în moli pe litru și α este gradul de disociere. Trebuie luate măsuri de precauție pentru a exclude CO_2 . Detalii experimentale suplimentare și metoda de calcul sunt indicate în texte standard și în referințele (1), (6) și (7).

DATE ȘI RAPORTARE

Prelucrarea rezultatelor*Metoda de titrare*

PK_a se calculează pentru 10 puncte măsurate pe curba de titrare. Se calculează valoarea medie și deviația standard pentru valorile pK_a respective. Se include un grafic al pH-ului în funcție de volumul de acid sau de bază standard, împreună cu o prezentare sub formă de tabel.

Metode spectrofotometrice

Valoarea absorbției și pH-ul pentru fiecare spectru sunt indicate în tabel. Sunt calculate cel puțin cinci valori pK_a pornind de la puncte intermediare de date privind spectrele, iar valoarea medie și deviația standard pentru aceste rezultate sunt calculate, de asemenea.

Metoda conductometrică

Conductivitatea echivalentă Λ se calculează pentru fiecare concentrație de acid și pentru fiecare concentrație a unui amestec cu un echivalent de acid la care se adaugă 0,98 echivalent de hidroxid de sodiu fără carbonați. Acidul este în exces pentru a preveni un exces de OH^- datorat hidrolizei. $1/\Lambda$ este reprezentată în raport cu O_2C , iar Λ_0 a sării poate fi determinată prin extrapolare la concentrație zero.

Λ_0 a acidului poate fi calculată utilizând valorile din literatura de specialitate pentru H^+ și Na^+ . PK_a poate fi calculată din $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_0$ și $K_a = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$ pentru fiecare concentrație. Valori mai bune pentru K_a pot fi obținute prin efectuarea de corecții pentru mobilitate și activitate. Se calculează valoarea medie și deviația standard ale pK_a .

Raport de testare

Toate datele primare și valorile calculate pK_a trebuie prezentate împreună cu metoda de calcul (de preferință într-un format tabelar astfel cum se sugerează în referința 1), precum și parametrii statistici descriși mai sus. Pentru metodele de titrare, se prezintă detalii cu privire la standardizarea soluțiilor de titrare.

Pentru metoda spectrofotometrică, se prezintă toate spectrele. Pentru metoda conductometrică, se raportează detalii cu privire la determinarea constantei celulare. Se furnizează informații cu privire la tehnica utilizată, metodele de analiză și natura oricăror soluții tampon utilizate.

Se raportează temperatura (temperaturile) de testare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) Albert, A. & Sergeant, E.P.: *Ionization Constants of Acids and Bases*, Wiley, Inc., New York, 1962.
- (2) Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, *Env. Sci. Tech.* 3, II, p. 1186-1188 (1969).

- (3) ASTM D 1293 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.
 - (4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.
 - (5) Clark, J. & Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. *Chem. Ind. (London)* 281, (March 1973).
 - (6) ASTM D 1125 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.
 - (7) Standard Method 205 – APHA/AWWA/NPCF [a se vedea mai sus (4)].
 - (8) *Handbook of Chemistry and Physics*, 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980)."
- (2) În partea B, capitolul B.5 se înlocuiește cu următorul text:

„B.5 COROZIUNE/IRITAȚIE OCULARĂ ACUTĂ

INTRODUCERE

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE (TG) privind testarea nr. 405 (2012). Orientările OCDE privind testarea pentru testarea substanțelor chimice sunt revizuite periodic pentru a se asigura că acestea reflectă cele mai bune cunoștințe științifice disponibile. În revizuirile anterioare ale respectivei orientări privind testarea s-a acordat o atenție deosebită posibilităților îmbunătățiri prin evaluarea tuturor informațiilor existente cu privire la substanța chimică de testat pentru a se evita testarea inutilă pe animale de laborator și, prin urmare, pentru a aborda preocupările privind bunăstarea animală. TG 405 (adoptată în 1981 și actualizată în 1987, 2002 și 2012) include recomandarea ca, înainte de efectuarea testării *in vivo* descrise pentru coroziune/iritație oculară acută, să fie efectuată o analiză a valorii probante (1) a datelor existente relevante. În cazul în care datele disponibile sunt insuficiente, se recomandă ca acestea să fie dezvoltate prin aplicarea testării secvențiale (2) (3). Strategia de testare include efectuarea unor teste *in vitro* validate și acceptate și este prezentată ca o completare la această metodă de testare. În sensul Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH) ⁽¹⁾, o strategie de testare integrată este inclusă, de asemenea, în Orientarea ECHA relevantă (21). Testarea pe animale se efectuează doar în cazul în care se determină necesitatea acesteia, după ce se iau în considerare metodele alternative disponibile și prin utilizarea celor determinate a fi adecvate. La momentul redactării acestei metode de testare actualizate, există cazuri în care utilizarea acestei metode de testare este încă necesară sau impusă în temeiul unor cadre de reglementare.

Ultima actualizare s-a axat în principal pe utilizarea de analgezice și anestezice, fără a avea impact asupra conceptului de bază și asupra structurii orientării privind testarea. ICCVAM ⁽²⁾ și un grup științific independent și internațional de revizuire inter pares au analizat utilitatea și limitele utilizării în mod obișnuit de anestezice topice, analgezice sistemice și puncte finale umane în timpul testării de siguranță *in vivo* pentru iritația oculară (12). În urma evaluării, s-a constatat că utilizarea de anestezice topice și analgezice sistemice ar putea evita integral sau în mare parte durerea și suferința fără a afecta rezultatul testului și s-a recomandat utilizarea întotdeauna a acestor substanțe. Această metodă de testare ia în considerare revizuirea respectivă. Anestezicele topice, analgezicele sistemice și punctele finale umane sunt utilizate în mod obișnuit în timpul testării *in vivo* a iritației și coroziunii oculare acute. Excepțiile de la utilizarea acestora trebuie justificate. Îmbunătățirile descrise în prezenta metodă vor reduce în mod substanțial sau vor evita durerea și suferința animalelor în cele mai multe situații de testare în care testarea *in vivo* pentru siguranță oculară este încă necesară.

Gestionarea echilibrată și preemptivă a durerii trebuie să includă (i) un pretratament de rutină cu anestezic topic (de exemplu, proparacaină sau tetracaină) și un analgezic sistemic (de exemplu, buprenorfină), (ii) schema post-tratament de rutină a analgezicelor sistemice (de exemplu, buprenorfină și meloxicam), (iii) observarea, monitorizarea și înregistrarea planificată a animalelor pentru identificarea semnelor clinice de durere și/sau suferință și (iv) observarea, monitorizarea și înregistrarea planificată a naturii, gravității și evoluției tuturor leziunilor oculare. Mai multe detalii sunt furnizate în versiunea actualizată a procedurilor descrisă mai jos. După administrarea substanței chimice de testat nu se administrează anestezice topice sau analgezice suplimentare, în vederea evitării interferențelor cu studiul. Analgezicele cu acțiune antiinflamatorie (de exemplu, meloxicam) nu se aplică topic, iar dozele utilizate sistemic nu trebuie să interfereze cu efectele oculare.

Definițiile sunt prevăzute în apendicele la metoda de testare.

⁽¹⁾ Regulamentul (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului din 18 decembrie 2006 privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH), de înființare a Agenției Europene pentru Produse Chimice, de modificare a Directivei 1999/45/CE și de abrogare a Regulamentului (CEE) nr. 793/93 al Consiliului și a Regulamentului (CE) nr. 1488/94 al Comisiei, precum și a Directivei 76/769/CEE a Consiliului și a Directivelor 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE și 2000/21/CE ale Comisiei. JO L 304, 22.11.2007, p. 1.

⁽²⁾ Comitetul SUA de coordonare la nivel de agenții privind validarea metodelor alternative.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

În interesul acurateții științifice și al bunăstării animalelor, testele *in vivo* nu trebuie luate în considerare până când toate datele relevante disponibile pentru potențialul de corozivitate/iritație oculară al substanței chimice nu au fost evaluate într-o analiză a valorii probante a datelor. Astfel de date includ dovezi din studiile deja efectuate asupra oamenilor și/sau asupra animalelor de laborator, dovezi privind caracterul coroziv/iritant al uneia sau mai multor substanțe chimice înrudite structural sau ale unor amestecuri de astfel de substanțe, date demonstrând o puternică aciditate sau alcalinitate a substanței chimice (4) (5) și rezultatele validate și acceptate ale unor teste *in vitro* sau *ex vivo* de corozivitate cutanată și de corozivitate/iritație oculară (6) (13) (14) (15) (16) (17). Este posibil ca astfel de studii să fi fost efectuate înaintea sau ca urmare a unei analize a valorii probante a datelor.

Pentru anumite substanțe chimice, o astfel de analiză poate indica necesitatea efectuării unor studii *in vivo* privind potențialul de corozivitate/iritație oculară al substanței chimice. În toate aceste cazuri, înainte de a lua în considerare efectuarea testului ocular *in vivo*, este de preferat să se efectueze mai întâi un studiu *in vitro* și/sau *in vivo* asupra efectelor de corozivitate cutanată ale substanței chimice, studiu care ar trebui să fie evaluat în conformitate cu strategia de testare secvențială din metoda de testare B.4 (7) sau strategia de testare integrată descrisă în Orientarea ECHA (21).

O strategie de testare secvențială, care include efectuarea de teste validate *in vitro* sau *ex vivo* pentru corozivitate/iritație oculară, este inclusă drept Supliment la această metodă de testare și, în scopul REACH, în Orientarea ECHA (21). Se recomandă aplicarea acestei strategii de testare înainte de efectuarea testului *in vivo*. Pentru substanțele chimice noi, se recomandă o abordare de testare graduală pentru obținerea unor date științifice exacte privind caracterul coroziv/iritant al substanței chimice. În cazul substanțelor chimice existente pentru care nu există date suficiente privind corozivitatea/iritația cutanată și oculară, strategia poate fi utilizată pentru completarea datelor lipsă. Utilizarea unei strategii sau proceduri diferite de testare sau decizia de a nu utiliza o abordare de testare graduală trebuie justificate.

PRINCIPIUL TESTULUI IN VIVO

În urma unui pretratament cu un analgezic sistemic și după inducția adecvată a anesteziei topice, substanța chimică de testat se aplică, într-o singură doză, pe un ochi al animalului de laborator; celălalt ochi este utilizat drept martor. Nivelul de iritație/corozivitate oculară se evaluează prin examinarea leziunilor care afectează conjunctiva, corneea și irisul, la intervale prestabilite. Se descriu, de asemenea, celelalte efecte asupra ochiului sau efecte sistemice adverse, pentru a asigura o evaluare completă a efectelor. Durata studiului trebuie să fie suficientă pentru a evalua reversibilitatea sau ireversibilitatea efectelor.

Animalele care manifestă semne de suferință și/sau dureri profunde în orice etapă a testului sau leziuni de tipul celor întâlnite în punctele finale umane descrise în această metodă de testare (a se vedea punctul 26) sunt eutanasiate, iar substanța chimică este evaluată în consecință. Criteriile pentru luarea deciziei de eutanasiere în condiții umane a animalelor muribunde sau suferinde fac obiectul unui document de orientare al OCDE (8).

PREGĂTIREA PENTRU TESTUL IN VIVO

Selectarea speciilor

Se utilizează, de preferat, exemplare adulte, tinere, sănătoase de iepure albinos. Utilizarea altor șușe sau specii trebuie justificată.

Pregătirea animalelor

Cu 24 de ore înainte de începerea testului, se examinează ambii ochi ai animalului de experiență selectat provizoriu. Nu se utilizează exemplarele care prezintă iritații sau defecte oculare sau leziuni corneene preexistente.

Condiții de adăpostire și de hrănire

Animalele se adăpostesc individual. În spațiul pentru adăpostirea animalelor de experiență se asigură o temperatură de 20 °C (± 3 °C) pentru iepuri. Cu toate că umiditatea relativă trebuie să fie de cel puțin 30 % și, de preferință, să nu depășească 70 % decât în timpul operațiunilor de curățare a sălii, obiectivul de umiditate este de 50-60 %. Spațiul se iluminează artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Se evită intensitatea excesivă a luminii. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă.

PROCEDURA DE TESTARE

Utilizarea de anestezice topice și analgezice sistemice

Următoarele proceduri sunt recomandate pentru a se evita sau reduce la minimum durerea și suferința în procedurile de testare pentru siguranță oculară. Procedurile alternative, care au fost determinate ca oferind aceeași sau o mai bună evitare sau combatere a durerii și suferinței, pot fi substituite.

- Cu șaizeci de minute înainte de aplicarea substanței chimice de testat (TCA), se administrează 0,01 mg/kg buprenorfină prin injectare subcutanată (s.c.) pentru a asigura un nivel terapeutic de analgezie sistemică. Buprenorfină și altele analgezice opioide similare, administrate sistemic, nu sunt cunoscute sau nu se preconizează să modifice reacțiile oculare (12).
- Cu cinci minute înainte de TCA, se aplică în fiecare ochi una sau două picături de anestezic topic ocular (de exemplu, clorhidrat de proparacaină 0,5 % sau clorhidrat de tetracaină 0,5 %). Pentru a evita posibila interferență cu studiul, se recomandă utilizarea unui anestezic topic care nu conține conservanți. Ochiul fiecărui animal care nu este tratat cu o substanță chimică de testat, dar care este tratat cu anestezia topică, este utilizat ca martor. În cazul în care se anticipează că substanța chimică testată va provoca dureri sau suferințe semnificative, aceasta nu se testează, în mod normal, *in vivo*. Cu toate acestea, în cazul în care există îndoieli sau atunci când este necesar, se ia în considerare utilizarea unor administrări suplimentare de anestezic topic la intervale de 5 minute înainte de TCA. Utilizatorii trebuie să cunoască faptul că administrările multiple de anestezice topice pot cauza o creștere ușoară a gradului de severitate și/sau a timpului necesar pentru ca leziunile induse de substanța chimică să se vindece.
- Opt ore după TCA, sunt administrate 0,01 mg/kg buprenorfină s.c. și 0,5 mg/kg meloxicam s.c. pentru a asigura un nivel terapeutic continuu de analgezice sistemice. În pofida faptului că nu există date care să sugereze că meloxicamul are efecte antiinflamatorii asupra ochilor atunci când este administrat s.c. o dată pe zi, meloxicamul nu trebuie administrat până la cel puțin 8 ore după TCA pentru a evita orice posibilă interferență cu studiul (12).
- După tratamentul post-TCA din primele 8 de ore, se administrează 0,01 mg/kg buprenorfină s.c. la intervale de 12 ore, asociat cu 0,5 mg/kg meloxicam s.c. la fiecare 24 de ore, până la vindecarea leziunilor oculare și la dispariția oricărui semn clinic de durere și de stres. Sunt disponibile preparate analgezice cu eliberare susținută care pot fi luate în considerare pentru a reduce frecvența de dozare cu analgezice.
- Analgezice de „salvare” se administrează imediat după TCA în cazul în care analgezia preemptivă și anestezia topică sunt insuficiente. În cazul în care un animal prezintă semne de durere și suferință pe parcursul studiului, o doză „salvatoare” de 0,03 mg/kg buprenorfină s.c. se administrează imediat și se repetă la fiecare 8 ore, dacă se consideră necesar, în loc de 0,01 mg/kg s.c. la fiecare 12 ore. La fiecare 24 de ore se administrează meloxicam 0,5 mg/kg s.c., asociat cu doza „salvatoare” de buprenorfină, dar nu mai repede de cel puțin 8 ore post TCA.

Aplicarea substanței chimice de testat

Substanța chimică de testat se aplică în sacul conjunctival al unui ochi al fiecărui animal, după îndepărtarea delicată a pleoapei inferioare de pe globul ocular. Pleoapele se țin apoi lipite pentru circa o secundă, pentru a preveni pierderea materialului. Celălalt ochi, care nu se tratează, se utilizează ca martor.

Irigația

Ochii animalelor testate nu se spală timp de cel puțin 24 de ore de la instilația substanței chimice de testat, cu excepția cazului în care substanța este solidă (a se vedea punctul 18) și a cazului în care apar efecte corozive sau iritante imediate. După 24 de ore, se procedează la o spălare, dacă se consideră necesar.

Nu se recomandă utilizarea unui grup satelit de animale pentru a analiza influența spălării, cu excepția cazului în care acest lucru se justifică științific. În cazul în care este necesar un grup satelit, se folosesc doi iepuri. Se descriu detaliat condițiile de spălare, de exemplu momentul spălării; compoziția și temperatura soluției utilizate; durata, volumul și viteza de aplicare.

Nivelul dozei

(1) Testarea lichidelor

Pentru testarea lichidelor se utilizează o doză de 0,1 ml. Nu se utilizează pulverizatoare cu pompă pentru instilarea substanței chimice direct în ochi. Se recomandă extragerea lichidului și colectarea acestuia într-un container înainte de instilarea a 0,1 ml în ochi.

(2) Testarea solidelor

La testarea solidelor, a pastelor și a substanțelor sub formă de particule, cantitatea utilizată are un volum de 0,1 ml sau o greutate de cel mult 100 mg. Substanța chimică de testat se macină într-un praf fin. Volumul materialului solid se măsoară după o compactare delicată, de exemplu, bătând ușor cu palma recipientul de măsură. În cazul în care substanța chimică solidă de testat nu a fost îndepărtată din ochiul animalului de experiență prin mecanisme fiziologice în primul moment prestabilit de observare, și anume la o oră după tratament, ochiul poate fi spălat cu o soluție salină sau cu apă distilată.

(3) Testarea aerosolilor

Se recomandă colectarea conținutului tuturor pulverizatoarelor cu pompă și aerosolilor înainte de instilarea în ochi. Singura excepție o constituie substanțele chimice în containere sub presiune pentru aerosoli, care nu pot fi colectate din cauza vaporizării. În acest caz, ochiul se ține deschis, iar substanța chimică de testat se administrează în ochi cu un singur jet de circa o secundă, de la o distanță de 10 cm perpendicular pe ochi. Distanța poate varia în funcție de presiunea pulverizatorului și conținutul acestuia. Se evită lezarea ochiului din cauza presiunii pulverizatorului. În unele cazuri, se poate dovedi necesar să se evalueze posibilitatea provocării unor leziuni „mecanice” ochiului prin forța pulverizatorului.

O estimare a dozei dintr-un aerosol poate fi efectuată simulând testul astfel: substanță chimică se pulverizează pe o bucată de hârtie de cântărit, printr-o deschidere de dimensiunea ochiului unui iepure amplasată direct în fața hârtiei. Cantitatea pulverizată în ochi se estimează pe baza creșterii greutății hârtiei. Pentru substanțele chimice volatile, doza poate fi estimată prin cântărirea unui recipient în care este pulverizată substanța, înainte și după îndepărtarea substanței chimice de testat.

Testul inițial (test in vivo de iritație/coroziune oculară pe un animal)

Se recomandă ca testul *in vivo* să se efectueze inițial pe un singur animal (a se vedea Suplimentul la prezenta metodă de testare: O strategie de testare secvențială pentru iritația și coroziunea oculară). Observațiile trebuie să permită determinarea gravității și a reversibilității înainte de a se trece la un test de confirmare pe un al doilea animal.

În cazul în care rezultatele acestui test indică faptul că substanța chimică este corozivă sau foarte iritantă la nivel ocular utilizându-se procedura descrisă, nu se efectuează teste suplimentare de iritație oculară.

Testul de confirmare (test in vivo de iritație oculară pe animale suplimentare)

În cazul în care nu se observă un efect coroziv sau sever iritant la testul inițial, reacția iritantă sau negativă se confirmă utilizând maximum alte două animale. În cazul în care se observă un efect iritant la testul inițial, se recomandă efectuarea testului de confirmare în mod secvențial, pe câte un animal, și nu prin expunerea simultană a celor două animale suplimentare. În cazul în care la al doilea animal apar efecte corozive sau puternic iritante, testul se întrerupe. În cazul în care rezultatele celui de-al doilea animal sunt suficiente pentru a permite determinarea clasificării pericolelor, nu se efectuează teste suplimentare.

Perioada de observație

Durata perioadei de observație trebuie să fie suficientă pentru evaluarea completă a amplitudinii și a reversibilității efectelor observate. Cu toate acestea, experimentul se încheie dacă animalul manifestă semne de suferință sau dureri profunde (8). Pentru a determina reversibilitatea efectelor, animalele se observă timp de 21 de zile după administrarea substanței chimice de testat. În cazul în care reversibilitatea intervine înainte de expirarea celor 21 de zile, experimentul se încheie în momentul respectiv.

Observații clinice și punctarea reacțiilor oculare

Ochii se supun unei evaluări cuprinzătoare pentru a stabili prezența sau absența leziunilor oculare la o oră după TCA, urmată de evaluări cel puțin zilnic. Animalele se evaluează de mai multe ori pe zi în primele 3 zile pentru a se asigura că deciziile de eutanasiere sunt luate în timp util. Animalele utilizate în scopuri experimentale se evaluează în mod regulat în timpul perioadei de studiu pentru identificarea semnelor clinice de durere și/sau suferință (de exemplu, lovirea repetată cu piciorul, frecarea repetată a ochiului, clipire excesivă, lacrimare excesivă) (9) (10) (11), cel puțin de două ori pe zi, cu un interval de minim 6 de ore între observații sau mai des, dacă este necesar. Acest lucru este necesar (i) pentru a evalua în mod corespunzător animalele pentru a identifica semne de durere și suferință cu scopul a lua decizii în cunoștință de cauză cu privire la necesitatea de a mări doza de analgezice și (ii) pentru a evalua animalele pentru a identifica criteriile finale umane stabilite cu scopul de a lua decizii în cunoștință de cauză cu privire la adecvarea eutanasierii animalelor și pentru a se asigura că aceste decizii sunt luate în timp util. Colorarea cu fluoresceină se utilizează în mod obișnuit, iar atunci când se consideră necesar, se utilizează un biomicroscop cu lampă cu fantă (de exemplu, pentru evaluarea profunzimii leziunilor atunci când ulcerarea corneană este prezentă) ca adjuvant pentru detectarea și măsurarea leziunilor oculare și pentru a se evalua dacă au fost îndeplinite criteriile finale stabilite pentru eutanasiere în condiții umane. Fotografii digitale ale leziunilor observate pot fi colectate pentru referință și pentru a oferi o înregistrare permanentă a gradului de leziune oculară. Animalele nu se mențin în experiment mai mult decât este necesar pentru obținerea unor informații concludente. Animalele care prezintă semne profunde de durere sau suferință sunt eutanasiate imediat în condiții umane, iar substanța se evaluează în consecință.

Animalele care după instilare prezintă următoarele leziuni oculare sunt eutanasiate în condiții umane (a se vedea tabelul 1 pentru o descriere a punctării leziunilor): perforare corneană sau ulcerare corneană semnificativă, inclusiv stafilm; sânge în camera anterioară a ochiului; opacitate corneană de gradul 4; absența reflexului fotomotor (reacție a irisului de gradul 2) care persistă timp de 72 de ore; ulcerare a membranei conjunctivale; necroză a conjunctivelor și a membranei nictitante; sau desprinderea țesutului necrozat. Eutanasierea se justifică deoarece astfel de leziuni sunt, în general, ireversibile. În plus, se recomandă ca următoarele leziuni oculare să fie utilizate ca puncte finale umane pentru a încheia studiile planificate înainte de sfârșitul perioadei de observație de 21 de zile. Aceste leziuni sunt considerate predictive de leziuni iritante și corozive grave și leziuni care nu se preconizează a fi complet reversibile până la sfârșitul perioadei de observație de 21 de zile: profunzime gravă a leziunii (de exemplu, ulcerare corneană care se extinde dincolo de straturile stromale superficiale), distrugere a limbului în proporție de peste 50 % (după cum reiese din albirea țesutului conjunctival) și infecția oculară gravă (scurgere purulentă). O combinație de: vascularizare a suprafeței corneene (de exemplu, panus); suprafața colorării cu fluoresceină care nu se micșorează în timp, pe baza evaluărilor zilnice; și/sau lipsa de reepitelizare 5 zile după aplicarea substanței chimice de testat ar putea fi considerată, de asemenea, drept criterii posibil utile pentru a influența decizia clinică de a încheia prematur un studiu. Cu toate acestea, astfel de constatări, luate în considerare individual, sunt insuficiente pentru a justifica încheierea prematură a studiului. Odată ce au fost identificate efecte oculare severe, se consultă un medic veterinar curant sau calificat, specializat pe animale de laborator, sau personalul instruit pentru a identifica leziunile clinice pentru a efectua un examen clinic cu scopul de a determina dacă o combinație a acestor efecte justifică încheierea prematură a studiului. Nivelurile reacției oculare (conjunctivă, corneă și iris) se obțin și se înregistrează la 1, 24, 48 și 72 de ore de la aplicarea substanței chimice de testat (tabelul 1). Animalele care nu prezintă leziuni oculare pot fi eutanasiate după cel puțin 3 zile de la instilare. Animale cu leziuni oculare care nu sunt atât de grave sunt supuse observației până la dispariția leziunilor sau timp de 21 de zile, moment în care studiul se încheie. Observațiile se efectuează și se înregistrează la un minim de 1 oră, 24 de ore, 48 de ore, 72 de ore, 7 zile, 14 zile și 21 de zile pentru a determina starea și reversibilitatea sau ireversibilitatea leziunilor. Observații mai frecvente se efectuează, dacă este necesar, pentru a stabili dacă animalul testat se eutanasează din considerente umane sau este eliminat din studiu din cauza rezultatelor negative.

Nivelurile leziunilor oculare (tabelul 1) se înregistrează la fiecare examinare. Se înregistrează, de asemenea, orice altă leziune oculară (de exemplu, panus, colorare, modificări în camera anterioară) sau efecte sistemice adverse.

Pentru a facilita examinarea reacțiilor, se poate utiliza o lupă binoculară, o lampă portabilă cu fantă, un biomicroscop sau un alt dispozitiv adecvat. După înregistrarea observațiilor la 24 de ore, ochii pot fi examinați în continuare cu ajutorul fluoresceinei.

Punctarea reacțiilor oculare este, în mod evident, subiectivă. Pentru a promova armonizarea punctării reacțiilor oculare și pentru a veni în sprijinul laboratoarelor de testare și al persoanelor implicate în efectuarea și interpretarea observațiilor, personalul care efectuează observațiile trebuie să fie instruit corespunzător cu privire la sistemul de examinare utilizat.

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea rezultatelor

Punctajele iritației oculare se evaluează în legătură cu natura și gravitatea leziunilor, precum și cu reversibilitatea sau ireversibilitatea acestora. Punctajele individuale nu reprezintă un standard absolut pentru proprietățile iritante ale unei substanțe chimice, întrucât se evaluează și alte efecte ale substanței chimice de testat. În schimb, punctajele individuale trebuie privite ca valori de referință și sunt semnificative doar dacă sunt însoțite de o descriere și o evaluare completă a tuturor observațiilor.

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Motivația pentru testarea in vivo: analiza valorii probante a datelor existente din teste anterioare, inclusiv a rezultatelor strategiei de testare secvențiale:

- descrierea datelor relevante disponibile din testele anterioare;
- date derivate la fiecare etapă a strategiei de testare;
- descrierea testelor *in vitro* efectuate, inclusiv detalii privind procedurile, rezultatele obținute cu substanțele chimice de testat/de referință;
- descrierea studiului *in vivo* de iritație/coroziune dermică efectuat, inclusiv rezultatele obținute;
- analiza valorii probante a datelor pentru efectuarea studiului *in vivo*.

Substanța chimică de testat:

- date de identificare (de exemplu, denumirea chimică și numărul CAS, dacă este disponibil, puritate, impurități cunoscute, sursă, numărul lotului);
- natura fizică și proprietățile fizico-chimice (de exemplu, pH, solubilitate, stabilitate, reactivitatea cu apă);
- în cazul unui amestec, se identifică componentele, inclusiv datele de identificare ale substanțelor constitutive (de exemplu, denumiri chimice și, dacă sunt disponibile, numerele CAS) și concentrațiile lor;
- doza aplicată.

Vehicul:

- identificare, concentrație (dacă este cazul), volumul utilizat;
- justificarea alegerii vehiculului.

Animalele de experiență:

- specie/șușă utilizată, motivație pentru utilizarea altor animale decât iepurele albinos;
- vârsta fiecărui animal la începutul studiului;
- numărul de animale de fiecare sex participante la test și în grupurile martor (dacă este necesar);
- greutatea fiecărui animal la începutul și la sfârșitul testului;
- sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.

Anestezice și analgezice

- dozele și intervalele în care au fost administrate anestezice topice și analgezice sistemice;
- în cazul în care este utilizat anestezic local, identificarea, puritatea, tipul și potențiala interacțiune cu substanța chimică de testat.

Rezultate:

- descrierea metodei utilizate pentru punctarea iritației în fiecare moment de observare (de exemplu, lampă portabilă cu fantă, biomicroscop, fluoresceină);
- un tabel cu datele privind reacțiile iritante/corozive la fiecare animal în fiecare moment de observare, până la excluderea din test a fiecărui animal;
- o descriere narativă a gravității și a naturii iritației sau coroziei observate;
- o descriere a oricăror alte leziuni observate la nivel ocular (de exemplu, vascularizare, formarea unui panus, aderențe, colorare);
- descrierea efectelor adverse locale nonoculare și sistemice, înregistrări ale semnelor clinice de durere și suferință, fotografii digitale și concluzii ale examenului histopatologic, dacă sunt disponibile.

*Discutarea rezultatelor.***Interpretarea rezultatelor**

Extrapolarea rezultatelor studiilor de iritație oculară asupra animalelor la oameni este valabilă doar într-o măsură restrânsă. În multe cazuri, iepurele albinos este mai sensibil decât oamenii la substanțe cu proprietăți iritante sau corozive la nivel ocular.

La interpretarea datelor se acordă o atenție deosebită excluderii iritației generate de infecții secundare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) Barratt, M.D., *et al.*(1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, 410 – 429.
- (2) de Silva, O., *et al.*(1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, Food Chem. Toxicol 35, 159 – 164.
- (3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.
- (4) Young, J.R., *et al.*(1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, Toxicol. In Vitro, 2, 19 – 26.
- (5) Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH, J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 – 231.
- (6) Fentem, J.H., *et al.*(1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, Toxicology in vitro 12, p.483 – 524.
- (7) Capitolul B.4 din prezenta anexă, *Iritație/Coroziune dermică acută*.
- (8) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- (9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, May/June, 20-36.
- (10) National Research Council (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.
- (11) National Research Council (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

- (12) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences.

<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest-TMER.htm>

- (13) Capitolul B.40 din prezenta anexă, *Coroziunea cutanată in vitro: Testul rezistenței electrice transcutanate (RET)*.

- (14) Capitolul B.40bis din prezenta anexă, *Coroziune cutanată in vitro: Testare pe un model de piele umană*.

- (15) OECD (2006), Test No. 435: *In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

- (16) Capitolul B.47 din prezenta anexă, *Metoda de testare a opacității și permeabilității corneene la bovine pentru identificarea i) substanțelor chimice care produc lezarea oculară gravă și a ii) substanțelor chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară gravă sau lezarea oculară gravă*.

- (17) Capitolul B.48 din prezenta anexă, metoda de testare a ochiului izolat de pui pentru identificarea i) substanțelor chimice care produc lezarea oculară gravă și a ii) substanțelor chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară gravă sau lezarea oculară gravă.

- (18) U.S. EPA (2003), Label Review Manual: 3rd Edition, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.

- (19) UN (2011), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications.

- (20) EC (2008), Regulation (EC) No. 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No. 1907/2006. Official Journal of the European Union L353, 1-1355.

- (21) ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance.

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

Tabelul 1

Punctarea leziunilor oculare

Cornee	Grad
Opacitate: nivel de densitate (examinarea se face în zona cea mai densă) (*)	
Fără ulcerare sau opacitate	0
Zone dispersate sau difuze de opacitate (altele decât o ușoară atenuare a strălucirii normale); detaliile irisului clar vizibile	1
Zonă translucidă ușor perceptibilă; detaliile irisului ușor mascate	2
Zonă sidefată; detaliile irisului invizibile; dimensiunea pupilei greu perceptibilă	3

Corneea	Grad
Corneea opacă; iris invizibil din cauza opacității	4
Maximum posibil: 4	
Iris	
Normal	0
Pliuri vizibil mai adânci, congestie, tumefiere, hiperemie pericorneană moderată; sau injectare; iris reactiv la lumină (o reacție lentă este considerată a fi un efect)	1
Hemoragie, distrugere marcată sau absența reacției la lumină	2
Maximum posibil: 2	
Conjunctiva	
Roșeață (se aplică conjunctivelor palpebrală și oculară; fără corneea și iris)	
Normal	0
Hiperemie evidentă a anumitor vase sanguine (ochi injectați)	1
Colorație purpurie difuză; vasele individuale greu perceptibile	2
Colorație roșie susținută difuză	3
Maximum posibil: 3	
Chemosis	
Tumefiere (se referă la pleoape și/sau la membranele nictitante)	
Normal	0
Tumefiere superioară stării normale	1
Tumefiere evidentă, cu eversiunea parțială a pleoapelor	2
Tumefiere cu pleoapele aproape pe jumătate închise	3
Tumefiere cu pleoape mai mult decât jumătate închise	4
Maximum posibil: 4	
(*) Suprafața cu opacitate corneeană se notează	

Apendice

DEFINIȚII

Rezerva acidă/alcalină: Pentru preparatele acide, aceasta este cantitatea (g) de hidroxid de sodiu/100 g de preparat necesar pentru a produce un anumit pH. Pentru preparatele alcaline, aceasta este cantitatea (g) de hidroxid de sodiu echivalent cu g de acid sulfuric/100 g de preparat necesar pentru a produce un anumit pH (Young *et al.* 1988).

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Substanță neiritantă: Substanțe care nu sunt încadrate în categoriile EPA I, II, sau III de iritanți oculari; sau categoriile GHS 1, 2, 2A, sau 2B de iritanți pentru ochi; sau categoriile UE 1 sau 2 (17) (18) (19).

Substanță având un caracter coroziv la nivel ocular: (a) O substanță chimică care provoacă leziuni tisulare ireversibile la nivelul ochiului; (b) Substanțe chimice care se încadrează în categoria GHS 1 de iritanți pentru ochi, sau categoria EPA I de iritanți oculari sau categoria UE 1 de iritanți oculari (17) (18) (19).

Iritant ocular: (a) Substanță chimică care produce o modificare reversibilă la nivelul ochiului; (b) Substanțe chimice care se încadrează în categoriile EPA II sau III de iritanți oculari; sau categoriile GHS 2, 2A sau 2B de iritanți pentru ochi; sau categoria UE 2 (17) (18) (19).

Substanță cu potențial iritant sever: (a) O substanță chimică care provoacă lezarea tisulară la nivelul ochiului care nu se vindecă în 21 de zile de la aplicare sau care provoacă o slăbire fizică severă a vederii; (b) Substanțe chimice care se încadrează în categoria GHS 1 de iritanți pentru ochi sau categoria EPA I de iritanți oculari sau categoria UE 1 (17) (18) (19).

Substanță chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare.

Abordare secvențială: O strategie de testare în trepte în cadrul căreia toate informațiile existente privind o substanță chimică de testat sunt revizuite într-o anumită ordine utilizând un proces de evaluare a forței probante în fiecare etapă pentru a determina dacă sunt disponibile suficiente informații pentru o decizie privind clasificarea riscului, înainte de a trece la etapa următoare. Dacă potențialul iritant al unei substanțe chimice de testat poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, nu este necesară o testare suplimentară. Dacă potențialul iritant al unei substanțe chimice de testat nu poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, o procedură de testare secvențială pe animale se efectuează până în momentul în care se poate realiza o clasificare lipsită de echivoc.

Valoare probantă a datelor (proces): Punctele forte și punctele slabe ale unui set de informații sunt utilizate ca bază pentru o concluzie care nu poate evidentă din datele individuale.

SUPLEMENT LA METODA DE TESTARE B.5 ⁽¹⁾

O STRATEGIE DE TESTARE SECVENȚIALĂ PENTRU IRITAȚIA ȘI COROZIUNEA OCULARĂ

Considerente generale

În interesul acurateței științifice și al bunăstării animalelor, este important să se evite utilizarea inutilă a animalelor de experiență și să se reducă la minimum testările care pot produce reacții grave la animale. Este necesar să se evalueze toate informațiile privind o substanță chimică care sunt relevante pentru potențialul caracter coroziv /iritant la nivel ocular al acesteia înainte de a lua în considerare testarea *in vivo*. Este posibil să existe deja date suficiente pentru clasificarea unei substanțe chimice de testat în ceea ce privește potențialul său coroziv sau iritant la nivel ocular, fără a mai fi necesar să se efectueze teste pe animale de laborator. Prin urmare, prin utilizarea unei analize a valorii probante a datelor și a unei strategii de testare secvențiale se reduce la minimum necesitatea de a efectua teste *in vivo*, în special dacă substanța chimică are potențialul de a produce reacții grave.

Se recomandă utilizarea unei analize a valorii probante a datelor pentru a evalua informațiile existente privind potențialul iritant și coroziv la nivel ocular al substanțelor chimice și pentru a se stabili dacă este necesară efectuarea unor studii suplimentare, altele decât studii oculare *in vivo*, pentru caracterizarea acestui potențial. Dacă sunt necesare studii suplimentare, se recomandă aplicarea strategiei de testare secvențiale pentru obținerea datelor experimentale relevante. Pentru substanțele care nu au fost testate anterior, se recomandă aplicarea strategiei de testare secvențiale pentru obținerea datelor necesare pentru evaluarea potențialului său coroziv/iritant la nivel ocular. Inițial, strategia de testare descrisă în prezentul supliment a fost dezvoltată în cadrul unui atelier de lucru OCDE (1). Ulterior, aceasta a fost susținută și extinsă în cadrul Sistemului armonizat integrat de clasificare a riscurilor substanțelor chimice pentru sănătatea oamenilor și mediu, adoptat la cea de a 28-a reuniune comună a Comitetului pentru substanțe chimice și a Grupului de lucru pentru substanțe chimice, în noiembrie 1998 (2), și actualizat de un grup de experți OCDE în anul 2011.

Cu toate că această strategie de testare nu face parte integrantă din metoda de testare B.5, aceasta reprezintă abordarea recomandată pentru determinarea caracteristicilor iritante/corozive la nivel ocular. Această abordare reprezintă atât cea mai bună practică, cât și un reper etic pentru testarea *in vivo* pentru iritație/coroziune oculară. Metoda de testare oferă indicații pentru efectuarea testului *in vivo* și rezumă factorii care trebuie evaluați înainte de un astfel de test. Strategia de testare secvențială oferă o abordare a valorii probante pentru evaluarea datelor existente privind proprietățile iritante/corozive la nivel ocular ale substanțelor chimice și o abordare graduală pentru generarea datelor relevante pentru substanțele chimice pentru care sunt necesare studii suplimentare sau care nu au făcut încă obiectul unor studii. Strategia include, într-o primă etapă, efectuarea unor teste *in vitro* sau *ex vivo* validate și acceptate, iar apoi aplicarea metodei de testare MT B.4 în condiții specifice (3) (4).

Descrierea strategiei de testare secvențiale

Înainte de efectuarea testelor incluse în strategia de testare secvențială (figură), se evaluează toate informațiile disponibile pentru a stabili dacă este necesară testarea oculară *in vivo*. Cu toate că se pot obține informații semnificative din evaluarea unor parametri specifici (de exemplu, o valoare extremă a pH-ului), se iau în considerare toate informațiile existente. Se evaluează toate datele relevante privind efectele substanței chimice în cauză și a analogilor săi pentru adoptarea unei decizii prin analiza valorii probante și se prezintă motivele care stau la baza deciziei. Se acordă o atenție specială datelor privind efectele substanței chimice asupra oamenilor și animalelor, urmate de rezultatele testelor *in vitro* sau *ex vivo*. Se evită, ori de câte ori este posibil, efectuarea unor studii *in vivo* pentru substanțele chimice corozive. Factorii luați în considerare în strategia de testare includ:

Evaluarea datelor existente privind efectele asupra oamenilor și/sau animalelor și/sau a datelor privind testarea *in vitro* din metode validate și acceptate la nivel internațional (etapa 1).

⁽¹⁾ Pentru utilizarea unei strategii de testare integrate pentru iritația oculară în temeiul REACH, a se vedea, de asemenea, Orientarea ECHA Cerințe privind informațiile și evaluarea securității chimice, capitolul R.7a: Orientări specifice parametrilor http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf.

Se iau în primul rând în considerare datele existente privind efectele asupra oamenilor, de exemplu studii clinice și ocupaționale și studii de caz și/sau date obținute din studii oculare asupra animalelor și/sau date in vitro din metode validate și acceptate la nivel internațional pentru iritarea/coroziunea la nivel ocular, întrucât acestea furnizează informații direct legate de efectele asupra ochilor. În continuare, se evaluează datele disponibile din studii de coroziiune/iritație dermică asupra oamenilor și/sau animalelor și/sau din studiile in vitro din metode validate și acceptate la nivel internațional pentru coroziiunea cutanată. Nu se instilează în ochii animalelor substanțe chimice având un caracter coroziv sau un potențial iritant sever cunoscut la nivel ocular sau substanțe chimice care prezintă efecte corozive sau puternic iritante la nivel dermic; astfel de substanțe chimice sunt considerate a fi corozive și/sau iritante, de asemenea, la nivel ocular. De asemenea, nu este necesară efectuarea de studii in vivo asupra substanțelor chimice pentru care există date suficiente obținute din studii oculare anterioare care atestă caracterul necoroziv sau neiritant.

Analiza relațiilor structură-activitate (RSA) (etapa 2).

Se iau în considerare rezultatele testelor asupra substanțelor chimice înrudite din punct de vedere structural, dacă sunt disponibile. În cazul în care sunt disponibile suficiente date privind efectele asupra oamenilor și/sau animalelor ale unor substanțe înrudite structural sau ale unor amestecuri de astfel de substanțe care indică un potențial coroziv/iritant la nivel ocular, se poate presupune că substanța chimică de testat în curs de evaluare va produce aceleași reacții. În astfel de cazuri, este posibil să nu fie necesare teste privind substanța chimică în cauză. Datele negative obținute de studiile asupra substanțelor înrudite structural sau asupra amestecurilor de astfel de substanțe nu constituie dovezi suficiente pentru caracterul necoroziv/neiritant al substanței chimice supuse strategiei de testare secvențiale. Se utilizează abordări RSA validate și acceptate pentru a identifica potențialul coroziv și iritant atât la nivel dermic, cât și la nivel ocular.

Proprietățile fizico-chimice și reactivitatea chimică (etapa 3).

Substanțele care prezintă valori extreme ale pH-ului precum $\leq 2,0$ sau $\geq 11,5$ pot produce efecte locale puternice. În cazul în care valorile extreme ale pH-ului constituie baza pentru identificarea unei substanțe chimice ca fiind corozivă sau iritantă la nivel ocular, se poate lua în considerare, de asemenea, rezerva sa acidă/alkalină (capacitatea de tamponare) (5) (6) (7). În cazul în care capacitatea de tamponare sugerează că este posibil ca o substanță chimică să nu fie corozivă la nivel ocular (de exemplu, substanțele chimice cu o valoare extremă a pH-ului și rezervă acidă/alkalină scăzută), se efectuează teste suplimentare pentru confirmare, de preferat prin utilizarea unui test in vitro sau ex vivo validat și acceptat (a se vedea punctul 10).

Analiza altor informații existente (etapa 4).

În această etapă se evaluează toate informațiile disponibile privind toxicitatea sistemică prin absorbție cutanată. Toxicitatea dermică acută a substanței chimice de testat trebuie să fie, de asemenea, luată în considerare. În cazul în care substanța chimică de testat s-a dovedit foarte toxică prin absorbție cutanată, este posibil să nu fie necesare teste oculare. În timp ce nu există în mod obligatoriu o relație între toxicitate dermică acută și iritația/coroziunea oculară, se poate presupune că un agent foarte toxic prin absorbție cutanată va prezenta o toxicitate ridicată la instilarea în ochi. Astfel de date pot fi analizate, de asemenea, între etapele 2 și 3.

Evaluarea corozivității cutanate a substanței chimice în cazul în care este necesară, de asemenea, în scopuri de reglementare (etapa 5).

În primul rând, trebuie evaluată coroziiunea cutanată și potențialul sever de iritare în conformitate cu metoda de testare B.4 (4) și suplimentul aferent (8), inclusiv utilizarea metodelor de testare in vitro a coroziiunii cutanate validate și acceptate la nivel internațional (9) (10) (11). În cazul în care se demonstrează că substanța chimică produce coroziiune sau iritație puternică la nivel dermic, aceasta poate fi considerată, de asemenea, corozivă sau puternic iritantă la nivel ocular. Prin urmare, nu sunt necesare teste suplimentare. În cazul în care substanța chimică nu este corozivă sau puternic iritantă la nivel dermic, se efectuează un test ocular in vitro sau ex vivo.

Rezultatele testelor in vitro sau ex vivo (etapa 6).

Substanțele chimice care au prezentat proprietăți corozive sau puternic iritante într-un test in vitro sau ex vivo (12) (13) validat și acceptat la nivel internațional pentru evaluarea specifică a coroziiunii/iritației la nivel ocular nu trebuie să fie testate pe animale. Se poate presupune că substanțele chimice în cauză vor produce efecte similare grave in vivo. În cazul în care nu sunt disponibile teste in vitro/ex vivo validate și acceptate, se trece peste etapa 6 și se continuă direct cu etapa 7.

Testul in vivo pe iepuri (etapele 7 și 8):

Testul ocular in vivo începe cu un test inițial efectuat pe un singur animal. În cazul în care rezultatele acestui test indică faptul că substanța chimică este puternic iritantă sau corozivă la nivel ocular, nu se efectuează teste suplimentare. În cazul în care testul nu relevă efecte corozive sau puternic iritante, se efectuează un test de confirmare pe alte două animale. În funcție de rezultatele testului de confirmare, pot fi necesare teste suplimentare. [a se vedea metoda de testare B.5]

STRATEGIE DE TESTARE ȘI EVALUARE A IRITAȚIEI/COROZIUNII OCULARE

	Activitate	Constatare	Concluzie
1	Date existente privind efectele asupra oamenilor și/sau animalelor și/sau date provenite din metode <i>in vitro</i> validate și acceptate la nivel internațional care indică efecte la nivel ocular Date existente privind efectele asupra oamenilor și/sau animalelor și/sau date provenite din metode <i>in vitro</i> validate și acceptate la nivel internațional care indică efecte corozive la nivel dermic Date existente privind efectele asupra oamenilor și/sau animalelor și/sau date provenite din metode <i>in vitro</i> validate și acceptate la nivel internațional care indică efecte puternic iritante la nivel dermic	Leziuni oculare grave Iritantă la nivel ocular Necorozivă și neiritantă la nivel ocular Corozivă la nivel dermic Puternic iritantă la nivel dermic	Efect extrem; substanță considerată corozivă la nivel ocular. Nu sunt necesare teste. Efect extrem; substanță considerată iritantă la nivel ocular. Nu sunt necesare teste. Efect extrem; substanță considerată necorozivă și neiritantă la nivel ocular. Nu sunt necesare teste. Coroziune oculară prezumată. Nu sunt necesare teste. Iritație oculară prezumată. Nu sunt necesare teste.
	↓		
	Nu sunt disponibile informații sau informațiile disponibile sunt neconcludente		
	↓		
2	Se efectuează analiza RSA pentru coroziune/iritație oculară Se ia în considerare analiza RSA pentru coroziune dermică	Se prevăd leziuni oculare grave Se prevede iritație oculară Se prevede coroziune dermică	Coroziune oculară prezumată. Nu sunt necesare teste. Iritație oculară prezumată. Nu sunt necesare teste. Coroziune oculară prezumată. Nu sunt necesare teste.
	↓		
	Nu se pot face prezumții sau prezumțiile sunt neconcludente sau negative		
	↓		
3	Se măsoară pH-ul (capacitatea de tamponare, dacă este relevantă)	pH ≤ 2 sau ≥ 11,5 (cu o capacitate de tamponare ridicată, dacă este relevantă)	Coroziune oculară prezumată. Nu sunt necesare teste.
	↓		
	2 < pH < 11,5 sau pH ≤ 2,0 sau ≥ 11,5 cu o capacitate de tamponare redusă, dacă este relevantă		
	↓		

	Activitate	Constatare	Concluzie
4	Se ia în considerare toxicitatea sistemică prin absorbție cutanată	Foarte toxică la concentrațiile care ar fi utilizate în testarea oculară.	Substanța chimică ar fi prea toxică pentru testare. Nu sunt necesare teste.
	↓ <i>Nu sunt disponibile astfel de informații sau substanța chimică nu este foarte toxică</i>		
5	Se evaluează potențialul de coroziune cutanată, cu titlu experimental, în conformitate cu strategia de testare din capitolul B.4 din prezenta anexă, în cazul în care este necesar în scopuri de reglementare	Reacție corozivă sau cu potențial iritant sever	Se presupune corozivă la nivel ocular. Nu sunt necesare teste suplimentare.
	↓ <i>Substanța chimică nu este corozivă sau puternic iritantă pentru piele</i>		
6	Să efectuează test(e) <i>in vitro</i> sau <i>ex vivo</i> validat(e) și acceptat(e) la nivel ocular	Reacție corozivă sau cu potențial iritant sever	Se presupune corozivă sau sever iritantă la nivel ocular, cu condiția ca testul efectuat să poată fi utilizat pentru a identifica substanțele cu caracter coroziv/sever iritant, iar substanța chimică să se încadreze în domeniul de aplicabilitate al testului. Nu sunt necesare teste suplimentare.
		Reacție iritantă	Se presupune iritantă la nivel ocular, cu condiția ca testul (testele) realizat(e) să poată fi utilizat(e) pentru a identifica în mod corect substanțele cu potențial coroziv, sever iritant și iritant, iar substanța chimică să se încadreze în domeniul de aplicabilitate al testului (testelor). Nu sunt necesare teste suplimentare.
		Reacție neiritantă	Se presupune neiritantă la nivel ocular, cu condiția ca testul (testele) realizat(e) să poată fi utilizat(e) pentru a identifica în mod corect substanțele cu caracter neiritant, să distingă în mod corect aceste substanțe de substanțele chimice iritante, sever iritante sau corozive la nivel ocular, iar substanța chimică să se încadreze în domeniul de aplicabilitate al testului. Nu sunt necesare teste suplimentare.
	↓ <i>Testul (testele) <i>in vitro</i> sau <i>ex vivo</i> la nivel ocular validat(e) și acceptat(e) nu poate (pot) fi utilizat(e) pentru a ajunge la o concluzie</i>		
7	Se efectuează testul inițial <i>in vivo</i> pe ochi de iepure, pe un singur animal	Leziuni oculare grave	Substanță considerată corozivă la nivel ocular. Nu sunt necesare teste suplimentare.
	↓ <i>Fără leziuni grave sau fără răspuns</i>		

	Activitate	Constatare	Concluzie
8	Se efectuează testul de confirmare pe unul sau două animale suplimentare	Substanță corozivă sau iritantă Substanță necorozivă sau iritantă	Substanță considerată corozivă sau iritantă la nivel ocular. Nu sunt necesare teste suplimentare. Substanță considerată neiritantă și necorozivă la nivel ocular. Nu sunt necesare teste suplimentare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 – 24 January 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.
- (4) Capitolul B.4 din prezenta anexă, Iritație/coroziune dermică acută.
- (5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19 – 26.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *in vitro* 12, p.483 – 524.
- (7) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 – 231.
- (8) Suplimentul la capitolul B.4 din prezenta anexă, O strategie de testare secvențială pentru iritația și corozionea oculară.
- (9) Capitolul B.40 din prezenta anexă, Corozione cutanată *in vitro*: Testul rezistenței electrice transcutanate (RET).
- (10) Capitolul B.40bis din prezenta anexă, Corozione cutanată *in vitro*; Testare pe un model de piele umană.
- (11) OECD (2006), Test No. 435: *In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.
- (12) Capitolul B.47 din prezenta anexă, Metoda de testare a opacității și permeabilității corneene la bovine pentru identificarea i) substanțelor chimice care produc lezarea oculară gravă și a ii) substanțelor chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară gravă sau lezarea oculară gravă.
- (13) Capitolul B.48 din prezenta anexă, Metoda de testare a ochiului izolat de pui pentru identificarea i) substanțelor chimice care produc lezarea oculară gravă și a ii) substanțelor chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară gravă sau lezarea oculară gravă.

(3) În partea B, capitolul B.10 se înlocuiește cu următorul text:

„B. 10. Testul *in vitro* de aberație cromozomială pe celule de mamifere

INTRODUCERE

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea nr. 473 a OCDE (2016). Acesta face parte dintr-o serie de metode de testare privind toxicologia genetică. A fost elaborat un document al OCDE care oferă informații succinte privind testarea pentru toxicologia genetică (1) și care trece în revistă modificările efectuate recent asupra orientărilor respective.

Scopul testului *in vitro* de aberație cromozomială este de a identifica substanțele chimice care provoacă aberații cromozomiale structurale în celulele de mamifere în cultură (2) (3) (4). Aberațiile structurale pot fi de două tipuri, cromozomiale sau cromatidice. Poliploidia (inclusiv endoreduplicarea) ar putea apărea în testele *in vitro* de aberație cromozomială. În timp ce substanțele aneugene pot determina poliploidie, poliploidia singură nu indică potențial aneugenic și poate indica pur și simplu perturbația ciclului celular sau citotoxicitate (5). Acest test nu este conceput pentru a măsura aneuploidia. Un test *in vitro* de micronucleu (6) ar fi recomandat pentru detectarea aneuploidiei.

Testul *in vitro* de aberație cromozomială poate să utilizeze culturi de linii celulare stabilite sau culturi de celule primare de origine umană sau de la rozătoare. Celulele utilizate se selectează în funcție de potențialul de dezvoltare în cultură, stabilitatea cariotipului (inclusiv numărul de cromozomi) și frecvența spontană a aberațiilor cromozomiale (7). În prezent, datele disponibile nu permit efectuarea de recomandări ferme, dar sugerează faptul că este important, atunci când se evaluează riscurile chimice, să se ia în considerare statutul *p53*, stabilitatea genetică (a cariotipului), capacitatea de regenerare a ADN-ului și originea celulelor (rozătoare *versus* umane) alese pentru testare. Utilizatorii acestei metode de testare sunt încurajați, prin urmare, să ia în considerare influența acestor și altor caracteristici ale celulelor privind performanța unei linii celulare în detectarea inducției de aberații cromozomiale, întrucât cunoștințele evoluează în acest domeniu.

Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITĂRI

Testele efectuate *in vitro* necesită, în general, utilizarea unei surse exogene de activare metabolică, cu excepția cazului în care celulele sunt competente din punct de vedere metabolic în ceea ce privește substanțele chimice de testat. Sistemul exogen de activare metabolică nu reproduce integral condițiile *in vivo*. Trebuie acordată atenție pentru a evita condiții care ar putea conduce la rezultate pozitive date de artefacte, și anume, daune cromozomiale care nu sunt cauzate de interacțiunea directă dintre substanțele chimice de testat și cromozomi; astfel de condiții includ modificările de pH sau de osmolalitate (8) (9) (10), interacțiunea cu componenții din mediu (11) (12) sau valori excesive ale citotoxicității (13) (14) (15) (16).

Această testare este utilizată pentru a detecta aberațiile cromozomiale care pot rezulta din evenimente clastogene. Analiza inducției de aberații cromozomiale se realizează prin utilizarea de celule în metafază. Prin urmare, este esențial ca celulele să ajungă în mitoză atât în culturile tratate, cât și în cele netratate. În cazul nanomaterialelor fabricate, pot fi necesare adaptări specifice ale acestei metode de testare, dar care nu sunt descrise în prezentul document.

Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare specific, trebuie să se examineze dacă, iar în caz afirmativ, din ce cauză, aceasta poate oferi rezultate adecvate în acest scop. Astfel de considerații nu sunt necesare în cazul în care există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

PRINCIPIUL TESTULUI

Culturile de celule umane sau de altă origine mamiferă sunt expuse la substanța chimică de testat în prezența și în absența unei surse exogene de activare metabolică, cu excepția cazului în care sunt utilizate celule cu capacitate metabolică adecvată (a se vedea punctul 13). După începutul expunerii culturilor de celule la substanța chimică de testat, acestea se tratează, la intervale de timp prestabilite și adecvate, cu o substanță chimică de inhibare a metafazei (de exemplu, colcemid sau colchicină), se recoltează, se colorează și celulele în metafază sunt analizate la microscop pentru detectarea aberațiilor de tip cromatidic și de tip cromozomial.

DESCRIEREA METODEI

Preparate*Celule*

Se pot utiliza diferite linii celulare [de exemplu, celule ovariene de hamster chinezesc (CHO), celule pulmonare de hamster chinezesc V79, celule pulmonare de hamster chinezesc (CHL)/IU, TK6] sau culturi de celule primare, inclusiv limfocite din sângele periferic uman sau al altor mamifere] (7). Alegerea liniilor celulare trebuie justificată din punct de vedere științific. În cazul în care se utilizează celule primare, din motive de bunăstare a animalelor, se ia în considerare utilizarea de celule primare de origine umană atunci când este posibil și de la care s-au prelevat probe în conformitate cu principiile și reglementările etice umane. Limfocitele din sângele periferic uman se obțin de la indivizi tineri (aproximativ 18-35 de ani), nefumători, fără vreo boală cunoscută sau expuneri recente la agenți genotoxici (de exemplu, substanțe chimice, radiații ionizante) la niveluri care ar conduce la creșterea incidenței generale a aberațiilor cromozomiale. Acest lucru ar garanta incidența generală redusă și consecvența a aberațiilor cromozomiale. Incidența de bază a aberațiilor cromozomiale crește odată cu vârsta, iar această tendință este mai pronunțată la femei decât la bărbați (17) (18). În cazul în care celulele provenite de la mai mulți donatori sunt puse în comun în vederea utilizării, se precizează numărul de donatori. Este necesar să se demonstreze că celulele s-au divizat de la începutul tratării cu substanța chimică de testat în celule prelevate. Culturile de celule sunt menținute într-o fază de creștere exponențială a celulelor (linii celulare) sau sunt stimulate să se împartă (culturi primare de limfocite) pentru a expune celulele în stadii diferite ale ciclului celular, având în vedere faptul că sensibilitatea stadiilor celulelor la substanțele chimice de testat poate să nu fie cunoscută. Celule primare care trebuie să fie stimulate cu agenți mitogenici pentru a se divide nu mai sunt sincronizate, în general, în timpul expunerii la substanța chimică de testat (de exemplu, limfocitele umane după 48 de ore de la stimularea mitogenică). Utilizarea celulelor sincronizate în timpul tratamentului nu este recomandată, dar poate fi acceptabilă dacă este justificată.

Medii și condiții de cultură

Se recomandă utilizarea mediilor de cultură și a condițiilor de incubare corespunzătoare (vasele de cultură, umiditate atmosferică de 5 % CO₂, după caz, temperatura de incubare de 37 °C) pentru dezvoltarea culturilor. Liniile celulare trebuie controlate în mod regulat pentru verificarea stabilității numărului modal de cromozomi și a absenței contaminării cu *micoplasmă* (7) (19), iar, în cazul în care se constată contaminarea sau în cazul în care numărul modal de cromozomi s-a modificat, celulele nu se mai utilizează. Durata normală a ciclului celular al liniilor celulare sau al culturilor primare utilizate în laboratorul de testare trebuie să fie stabilă și să corespundă cu caracteristicilor celulare publicate (20).

Pregătirea culturilor

Linii celulare: celulele se prepară plecând de la culturile de rezervă, se însămânțează în mediul de cultură la o anumită densitate astfel încât celulele în suspensie ori în culturile monostrat vor continua să crească exponențial până la recoltarea acestora (de exemplu, se evită confluența celulelor care cresc în monostrat).

Limfocite: sânge integral tratat cu un anticoagulant (de exemplu, heparină) sau limfocite separate sunt plasate în cultură (de exemplu, pentru 48 de ore pentru limfocite umane) în prezența unui mitogen [de exemplu, fitohemaglutinină (PHA) pentru limfocite umane] pentru a determina diviziunea celulară anterior expunerii la substanța chimică de testat.

Activare metabolică

Recurgerea la un sistem endogen de activare metabolică este necesară în cazul utilizării de celule dotate cu o capacitate endogenă metabolică inadecvată. Sistemul utilizat cel mai frecvent și care este recomandat implicit, cu excepția cazului în care se justifică altfel, constă într-o fracție postmitocondrială îmbogățită cu un cofactor (S9) preparată din ficat provenit de la rozătoare (în general, șobolani) tratat cu agenți de inducție enzimatică, de exemplu Aroclor 1254 (21) (22) (23) sau un amestec de fenobarbital și β -naftoflavonă (24) (25) (26) (27) (28) (29). Utilizarea acestui amestec nu este contrară prevederilor Convenției de la Stockholm privind poluanții organici persistenți (30) și s-a dovedit a fi la fel de eficientă ca Aroclor 1254 pentru inducția de oxidaze cu funcție mixtă (24) (25) (26) (28). Frația S9 este utilizată în general cu o concentrație cuprinsă între 1-2 % (v/v), dar poate fi majorată la 10 % (v/v) în mediul de test final. Utilizarea de produse care reduc indexul mitotic, în special produsele de complexare cu calciu (31) se evită în timpul tratamentului. Alegerea tipului și a concentrației de sistem exogen de activare metabolică sau a inductorului metabolic utilizat poate fi influențată de clasa de substanțe chimice testate.

Prepararea substanței chimice de testat

Substanțele chimice de testat în stare solidă sunt preparate în solvenți adecvați și sunt diluate, dacă este cazul, anterior tratamentului aplicat celulelor (a se vedea punctul 23). Substanțele chimice de testat în stare lichidă pot fi adăugate direct în sistemul de testare și/sau diluate anterior tratamentului sistemului de testare. Gazele sau substanțele chimice de testat volatile necesită o modificare adecvată a protocoalelor standard, de exemplu utilizarea de vase de cultură închise ermetic (32) (33) (34). Pregătirea de preparate de substanța chimică de testat se efectuează anterior tratamentului, cu excepția cazului în care există date care demonstrează stabilitatea acestora în condiții de stocare.

Condiții de testare

Solvenți

Solventul trebuie ales pentru a optimiza solubilitatea substanțelor chimice de testat fără a afecta desfășurarea testului, de exemplu, modificarea creșterii celulare, afectarea integrității substanței chimice de testat, reacția cu vasele de cultură, afectarea sistemului de activare metabolică. Se recomandă ca, în măsura în care este posibil, să se ia în considerare în primă instanță utilizarea unui solvent apos (sau un mediu de cultură). Solvenții bine stabiliți sunt, de exemplu, apa sau dimetilsulfoxidul. În general, solvenții organici nu trebuie să depășească 1 % (v/v) și solvenții apoși (soluție salină sau apă) nu trebuie să depășească 10 % (v/v) în mediul final de tratament. În cazul în care nu se utilizează solvenți bine stabiliți (de exemplu, etanol sau acetonă), utilizarea acestora trebuie justificată prin date care să indice compatibilitatea acestora cu substanțele chimice de testat, cu sistemul de testare, precum și absența genotoxicității la concentrația utilizată. În lipsa unor astfel de date justificative, este important să se includă martori netratați (a se vedea apendicele 1) pentru a demonstra că solventul ales nu induce efecte vătămătoare sau clastogene.

Măsurarea proliferării celulare și a citotoxicității și alegerea concentrațiilor de tratament

În momentul determinării celei mai mari concentrații a substanței chimice de testat, se evită concentrațiile susceptibile să producă răspunsuri pozitive date de artefacte, cum ar fi cele care produc citotoxicitate excesivă (a se vedea punctul 22), precipitate în mediul de cultură (a se vedea punctul 23) sau modificări importante de pH sau osmolalitate (a se vedea punctul 5). În cazul în care substanța chimică de testat provoacă o modificare importantă a pH-ului mediului în timpul adăugării sale, pH-ul ar putea fi ajustat prin tamponarea mediului final de tratament astfel încât să se evite rezultate pozitive date de artefacte și să se mențină condiții de cultură corespunzătoare.

Măsurătorile proliferării celulare se efectuează pentru a se asigura că un număr suficient de celulele tratate au ajuns la mitoză în timpul testului și că tratamentele sunt realizate la niveluri adecvate de citotoxicitate (a se vedea punctele 18 și 22). Citotoxicitatea se determină cu și fără activare metabolică în experimentul principal, utilizând un indicator corespunzător de moarte și creștere celulară. În timp ce evaluarea citotoxicității într-un test inițial poate fi utilă pentru o mai bună definire a concentrațiilor care urmează să fie utilizate în experimentul principal, un test inițial nu este obligatoriu. În cazul în care este efectuat, acesta nu trebuie să înlocuiască măsurarea citotoxicității în experimentul principal.

Dublarea relativă a populației (RPD) sau creșterea relativă a numărului de celule (RICC) reprezintă metode adecvate pentru evaluarea citotoxicității în teste citogenetice (13) (15) (35) (36) (55) (a se vedea formulele din apendicele 2). În cazul tratamentului pe termen lung și în cazul prelevării de probe după inițierea tratamentului, la intervale de timp mai mari cu de 1,5 ori durata ciclul celular normal (și anume, mai mult de 3 cicluri celulare în total), RPD ar putea subestima citotoxicitatea (37). În astfel de circumstanțe, RICC ar putea fi o măsură mai potrivită sau evaluarea citotoxicității după o perioadă de 1,5 ori durata ciclului celular normal ar fi o estimare utilă pe baza RPD.

În cazul limfocitelor din culturi primare, în timp ce indicele mitotic (MI) este o măsură a efectelor citotoxice/citostatice, acesta este influențat de timpul după tratament când se efectuează măsurătoarea, de mitogenul utilizat și de posibile perturbări ale ciclului celular. Cu toate acestea, MI este acceptabil deoarece alte măsurători de citotoxicitate pot fi dificile și nepractice și este posibil ca acestea să nu se poată aplica la populația țintă de limfocite care cresc ca răspuns la stimularea cu PHA.

În timp ce RICC și RPD reprezintă parametrii de citotoxicitate recomandați pentru liniile celulare și MI pentru cultura primară a limfocitelor, alți indicatori (de exemplu, integritatea celulară, apoptoza, necroza, ciclul celular) ar putea furniza informații suplimentare utile.

Se evaluează cel puțin trei concentrații de testat (fără a include martorii solvent și pozitivi) care îndeplinesc criteriile de acceptabilitate (citotoxicitate adecvată, număr de celule etc.). Indiferent de tipurile de celule (linii celulare sau culturi primare de limfocite), fiecare concentrație se poate testa fie pe culturi duplicat tratate, fie pe culturi unice tratate. În timp ce utilizarea a două culturi tratate este recomandată, culturile unice sunt acceptabile, de asemenea, cu condiția ca același număr total de celule să fie examinat atât pentru culturi unice, cât și pentru culturi duplicat. Utilizarea de culturi unice este deosebit de relevantă atunci când sunt evaluate mai mult de 3 concentrații (a se vedea punctul 31). Rezultatele obținute în culturile independente duplicat pentru o anumită concentrație pot fi grupate pentru analiza datelor (38). În cazul substanțelor chimice de testat fără citotoxicitate sau cu citotoxicitate ușoară, sunt adecvate, de regulă, intervale de concentrație de aproximativ 2 până la 3 ori mai mari. În prezența citotoxicității, concentrațiile de testat selectate trebuie să acopere un interval de la cea care produce citotoxicitate astfel cum este descris la punctul 22 și să includă concentrații la care există citotoxicitate moderată și ușoară sau fără citotoxicitate. Multe substanțe chimice de testat prezintă curbe concentrație-răspuns cu pante puternice, iar pentru a obține date la un nivel scăzut și moderat de citotoxicitate sau pentru a studia în detaliu relația doză-răspuns va fi necesară utilizarea concentrațiilor cu spațiu de separare redus și/sau mai mult de trei concentrații (culturi unice sau duplicat), în special în situațiile în care este necesară repetarea experimentului (a se vedea punctul 47).

În cazul în care concentrația maximă se bazează pe citotoxicitate, cea mai mare concentrație trebuie să vizeze atingerea unui nivel de citotoxicitate de $55 \pm 5\%$ utilizând parametrii de citotoxicitate recomandați (și anume, reducerea RICC și RPD pentru linii celulare și reducerea de MI pentru culturile primare de limfocite la $45 \pm 5\%$ a matorului negativ testat în paralel). Se acordă atenție deosebită interpretării rezultatelor pozitive care se găsesc numai în limita superioară a acestui interval de toxicitate de $55 \pm 5\%$ (13).

În cazul substanțelor chimice de testat cu solubilitate redusă care nu sunt citotoxice la concentrații mai mici decât concentrația minimă de insolubilitate, cea mai mare concentrație analizată produce o turbiditate sau un precipitat vizibil cu ochiul liber sau cu ajutorul unui microscop inversat la sfârșitul tratamentului cu substanța chimică de testat. Chiar dacă se manifestă citotoxicitate la un nivel sub concentrația minimă de insolubilitate, se recomandă testarea la o singură concentrație care produce turbiditate sau cu un precipitat vizibil deoarece efecte date de artefacte pot rezulta din precipitat. La concentrația care produce un precipitat, se acordă atenție deosebită pentru a se asigura că precipitatul nu interferează cu desfășurarea testului (de exemplu, colorare sau examinare). Determinarea solubilității în mediul de cultură înainte de experiment poate fi utilă.

În cazul în care nu se constată citotoxicitate sau precipitat, concentrația maximă de testare trebuie să corespundă cu 10 mM, 2 mg/ml or 2 μ l/ml, fiind reținută cea mai mică valoare (39) (40) (41). În cazul în care substanța chimică de testat nu are o compoziție definită, de exemplu, o substanță cu compoziție necunoscută sau variabilă, produse de reacție complexă sau materii biologice (UVCB) (42), extract de mediu etc., concentrația maximă ar trebui să fie mai mare (de exemplu, 5 mg/ml) în absența citotoxicității suficiente, pentru a crește concentrația fiecărei componente. Cu toate acestea, trebuie remarcat faptul că aceste cerințe pot fi diferite de cele pentru produsele farmaceutice umane (43).

Martori

Martori negativi testați în paralel (a se vedea punctul 15), constituiți dintr-un solvent singur în mediul de tratare și tratați în același condiții precum culturile de tratare, trebui incluși la fiecare moment de recoltare.

Martorii pozitivi testați în paralel sunt necesari pentru a demonstra abilitatea laboratorului de identificare a substanțelor clastogene în condițiile prevăzute în protocolul de testare utilizat și eficacitatea sistemului exogen de activare metabolică, după caz. Tabelul 1 de mai jos prezintă exemple de martori pozitivi. În mod alternativ, pot fi utilizate alte substanțe chimice martor pozitive, dacă acest lucru este justificat. Întrucât testele *in vitro* de genotoxicitate pe celule de mamifere sunt suficient de standardizate, utilizarea de martori pozitivi poate fi limitată la un clastogen care necesită activare metabolică. Acest rezultat unic al martorului pozitiv va demonstra atât activitatea sistemului de activare metabolică, cât și reactivitatea sistemului de testare, cu condiția ca acesta să fie efectuat concomitent cu testul neactivat utilizând aceeași durată de tratament. Cu toate acestea, tratamentul de lungă durată (fără S9) necesită propriul martor pozitiv deoarece durata tratamentului va fi diferită față de testul care utilizează activare metabolică. Fiecare martor pozitiv se utilizează în una sau mai multe concentrații susceptibile să determine creșteri reproductibile și detectabile ale frecvenței de fond pentru a demonstra sensibilitatea sistemului de testare (și anume, efectele sunt clare, dar nu dezvăluie imediat identitatea lamelor codate celui care le interpretează) și rezultatul nu trebuie să fie compromis de citotoxicitatea care depășește limitele specificate în metoda de testare.

Tabelul 1.

Substanțe chimice de referință recomandate pentru evaluarea competenței de laborator și pentru selectarea de martori pozitivi.

Categorie	Substanță chimică	Nr. CAS
1. Clastogeni activi fără activare metabolică		
	Metansulfonat de metil	66-27-3
	Mitomycină C	50-07-7
	4-nitrochinolină-N oxid	56-57-5
	Cistozină arabinozidă	147-94-4
2. Clastogeni care necesită activare metabolică		
	Benzo(a)piren	50-32-8
	Ciclofosfamidă	50-18-0

PROCEDURĂ**Tratamentul cu substanța chimică de testat**

Celulele în stadiu de proliferare se tratează cu substanța de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem de activare metabolică.

Momentul recoltării culturilor

Pentru o evaluare aprofundată, necesară pentru a încheia un rezultat negativ, toate cele trei condiții experimentale următoare se efectuează cu ajutorul unui tratament de scurtă durată cu și fără activare metabolică, precum și al unui tratament pe termen lung fără activare metabolică (a se vedea punctele 43, 44 și 45):

- Celulele se expun la substanța chimică de testat fără activare metabolică timp de 36 ore și se procedează la prelevarea probelor după un interval de timp egal cu de 1,5 ori durata ciclului celular normal după inițierea tratamentului (18),
- Celulele se expun la substanța de testat în prezența activării metabolice timp de 3-6 ore și se procedează la prelevarea probelor după un interval de timp egal cu de 1,5 ori durata ciclului celular normal de la inițierea tratamentului (18),
- Celulele se expun în mod continuu fără activare metabolică până la prelevarea de probe la un interval de timp egal cu de 1,5 ori durata ciclului celular normal. Anumite substanțe chimice (de exemplu, nucleotide analoage) pot să fie detectate mai ușor, prin prelungirea timpului de tratament/prelevare a probelor la mai mult de 1,5 ori durata ciclului celular normal (24).

În cazul în care oricare dintre condițiile experimentale de mai sus conduc la un rezultat pozitiv, se poate să nu fie necesar să se investigheze vreun alt regim de tratament dintre celelalte.

Prepararea cromozomilor

Culturile celulare se tratează cu colcemid sau colchicină, de regulă timp de una până la trei ore înainte de recoltare. Fiecare cultură celulară se recoltează și se prelucrează separat pentru prepararea cromozomilor. Prepararea cromozomilor include tratamentul hipotonic al celulelor, precum și fixarea și colorarea acestora. În culturile monostrat pot fi prezente celule mitotice (recunoscute după forma rotundă a acestora și după faptul că se detașează de pe suprafață) la sfârșitul perioadei de tratament de 3-6 ore. Deoarece celulele mitotice se detașează ușor, acestea pot fi pierdute în momentul înlăturării mediului care conține substanța chimică de testat. În cazul în care există dovezi privind o creștere substanțială a numărului de celule mitotice în comparație cu martorii, indicând probabil inhibarea fazei mitotice, celulele se colectează prin centrifugare și se adaugă înapoi la culturi pentru a evita pierderea de celule în mitoză și a celor amenințate de aberația cromozomială la momentul recoltării.

Analiză

Toate lamele, inclusiv cele cu martori pozitivi și negativi, trebuie codificate individual înaintea analizei microscopice pentru aberație cromozomială. Deoarece metodele de preparare a lamelor conduc adesea la o proporție de celule în metafază cu pierdere de cromozomi, toate celulele examinate trebuie, prin urmare, să conțină un număr de centromeri egal cu numărul modal ± 2 .

Pentru fiecare concentrație și fiecare martor se examinează cel puțin 300 de celule în metafază bine etalate în vederea stabilirii unei substanțe chimice de testat ca fiind cât mai clar negativă (a se vedea punctul 45). Cele 300 celule se împart în mod egal între culturile duplicat, atunci când sunt utilizate astfel de culturi. În cazul în care se utilizează culturi unice pentru fiecare concentrație (a se vedea punctul 21), cel puțin 300 de celule în metafază bine etalate trebuie examinate pentru această cultură unică. Examinarea a 300 de celule prezintă avantajul creșterii puterii statistice a testului și, în plus, valorile nule vor fi rar constatate (se preconizează a fi doar 5 %) (44). Numărul de celule în metafază examinat poate fi redus în cazul în care se constată un număr ridicat de celule cu aberații cromozomiale, iar substanța chimică de testat este considerată cât mai clar pozitivă.

Se examinează celulele cu aberație (aberații) cromozomială (cromozomiale) structurală (structurale), incluzând și excluzând lacunele. Rupturile și lacunele sunt definite în apendicele 1 în conformitate cu punctele 45 și 46. Aberațiile de tip cromatidian și cromozomial se înregistrează în mod separat și se clasifică în funcție de subtipuri (rupturi, schimburi). Procedurile utilizate în laborator trebuie să asigure că analiza de aberație cromozomială este efectuată de către un personal bine instruit și este supusă unei evaluări inter pares, dacă este cazul.

Cu toate că scopul testului este detectarea aberațiilor cromozomiale structurale, este important să se semnaleze cazurile de poliploidie și endoreduplicare, dacă se constată apariția acestora. (A se vedea punctul 2).

Competența laboratorului

Pentru a stabili o experiență suficientă în materie de testare înainte de utilizarea acestora pentru efectuarea testelor de rutină, laboratorul trebuie să fi efectuat o serie de experiențe cu substanțele chimice de referință pozitive acționând prin diferite mecanisme și diferiți martori negativi (utilizând diferiți solvenți/vehicul). Aceste răspunsuri ale martorilor pozitivi și negativi trebuie să fie în concordanță cu referințele bibliografice. Acest lucru nu se aplică laboratoarelor care au experiență, și anume, cele care au o bază de date anterioară disponibilă, astfel cum este definit la punctul 37.

O serie de substanțe chimice martor pozitive (a se vedea tabelul 1 de la punctul 26) se investighează cu tratamente de scurtă și lungă durată, fără activare metabolică, precum și cu tratament de scurtă durată în prezența activării metabolice, pentru a demonstra competența de a detecta substanțele chimice clastogene și de a determina eficacitatea sistemului de activare metabolică. Un interval de concentrații ale substanțelor chimice selectate se alege astfel încât să se obțină creșteri reproductibile și legate de concentrație peste nivelul de fond pentru a demonstra sensibilitatea și gama dinamică a sistemului de testare.

Date privind martorii testați anterior

Laboratorul trebuie să stabilească:

- o plajă de valori și o distribuție a martorilor pozitivi testați anterior,
- o plajă de valori și o distribuție a martorilor negativi (netratați, solvenți) testați anterior.

La obținerea primelor date pentru o distribuție a martorilor negativi testați anterior, martorii negativi testați în paralel trebuie să fie în concordanță cu datele publicate referitoare la martori, în cazul în care acestea există. Pe măsură ce tot mai multe date experimentale se adaugă la distribuția martorilor, martorii negativi testați în paralel trebuie să fie, în mod ideal, de până la 95 % din limitele de control ale respectivei distribuții (44) (47). Baza de date privind martori negativi testați anterior a laboratorului trebuie să fie construită inițial cu cel puțin 10 experimente, dar ar fi de preferat să conțină cel puțin 20 de experimente efectuate în conformitate cu condiții experimentale comparabile. Laboratoarele trebuie să utilizeze metode de control al calității precum grafice de control [de exemplu, diagrame C și X-bar (48)] pentru a identifica gradul de variabilitate al datelor privind martorii negativi și pozitivi ale acestora și pentru a dovedi faptul că metodologia se află „sub control” în cadrul respectivului laborator (44). Referințele bibliografice prezintă recomandări suplimentare privind modalitatea în care se pot construi și utiliza datele istorice (și anume, criteriile de includere și excludere a datelor în datele istorice și criteriile de acceptabilitate pentru un anumit experiment) (47).

Orice modificare la protocolul experimental se ia în considerare în ceea ce privește coerența acestora cu bazele de date privind martorii testați anterior existente ale laboratorului. Orice inconsecvență majoră trebuie să conducă la stabilirea unei noi baze de date privind martorii testați anterior.

Datele privind martorii negativi trebuie să cuprindă incidența celulelor cu aberații cromozomiale de la o cultură unică sau suma dintre culturile duplicate, astfel cum este descris la punctul 21. Martorii negativi testați în paralel trebuie să fie, în mod ideal, de până la limitele de control de 95 % ale distribuției bazelor de date privind martorii negativi testați anterior ale laboratorului (44) (47). În cazul în care datele privind martorii negativi testați în paralel se situează în afara limitelor de control de 95 %, acestea pot fi acceptabile pentru a fi incluse în distribuția martorilor testați anterior, în măsura în care datele respective nu reprezintă valori aberante extreme și există dovezi că sistemul de testare se află „sub control” (a se vedea punctul 37) și că nu s-au înregistrat defecțiuni tehnice sau umane.

DATE ȘI RAPORTARE

Prezentarea rezultatelor

Se evaluează procentul de celule cu aberație (aberații) cromozomială (cromozomiale) structurală (structurale). Se întocmește separat o listă cu aberațiile de tip cromatidian și cromozomial clasificate în funcție de subtipuri (rupturi, schimburi), specificând numărul și frecvența acestora pentru culturile experimentale și cele martor. Lacunele se înregistrează și se prezintă în mod separat, dar nu se includ în frecvența totală a aberațiilor. Procentajul de poliploidie și/sau endoreduplicare celulară este prezentat în cazul în care acestea sunt observate.

Se înregistrează rezultatele determinărilor concomitente de citotoxicitate realizate pentru toate culturile tratate și pentru cele martor negative și pozitive în principalul (principalele) experiment(e) de aberație.

Datele se indică individual pentru fiecare cultură. În plus, toate datele sunt sintetizate sub formă de tabele.

Criterii de acceptabilitate

Acceptarea unui test se bazează pe următoarele criterii:

- Martorul negativ testat în paralel este considerat acceptabil pentru adăugarea în baza de date privind martorii negativi testați anterior a laboratorului, astfel cum este descris la punctul 39.
- Martorii pozitivi testați în paralel (a se vedea punctul 26) trebuie să determine răspunsuri compatibile cu cele provenite din baza de date privind martorii pozitivi testați anterior și să producă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel.
- Criteriile de proliferare celulară în martorul solvent de control trebuie să fie îndeplinite (punctele 17 și 18).
- Toate cele trei condiții experimentale au fost testate, cu excepția cazului în care una a condus la rezultate pozitive (a se vedea punctul 28).
- Se analizează un număr adecvat de celule și concentrații (punctele 31 și 21).
- Criteriile de selecție ale concentrației maxime sunt conforme cu cele descrise la punctele 22, 23 și 24.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar pozitivă în cazul în care, în oricare dintre condițiile experimentale examinate (a se vedea punctul 28):

- a) cel puțin una dintre concentrațiile de testare prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel,
- b) atunci când este evaluată prin intermediul unui test de stabilire a tendinței corespunzător, creșterea depinde de doză,
- c) oricare dintre rezultate se află în afara distribuției de date privind martori negativi testați anterior (de exemplu, limite de control de 95 % pe baza distribuției Poisson; a se vedea punctul 39).

La îndeplinirea tuturor acestor criterii, se consideră că substanța chimică de testat poate produce aberații cromozomiale în celulele de mamifere în cultură în cadrul acestui sistem de testare. Referințele bibliografice prezintă recomandări pentru cele mai adecvate metode statistice (49) (50) (51).

Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar negativă în cazul în care, în toate condițiile experimentale examinate (a se vedea punctul 28):

- a) niciuna dintre concentrațiile de testare nu prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel,

- b) atunci când este evaluată prin intermediul unui test de stabilire a tendinței, nu se înregistrează nicio creștere legată de concentrație,
- c) toate rezultatele se situează în interiorul distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limite de control de 95 % pe baza distribuției Poisson; a se vedea punctul 39).

Prin urmare, substanța chimică de testat este considerată incapabilă să provoace aberații cromozomiale în celulele de mamifere în cultură în cadrul acestui sistem de testare.

Nu există nicio cerință referitoare la verificarea unui răspuns clar pozitiv sau negativ.

În cazul în care răspunsul nu este nici în mod clar negativ, nici în mod clar pozitiv astfel cum este descris mai sus sau pentru a asista la stabilirea relevanței biologice a unui rezultat, datele se evaluează de către experți și/sau prin intermediul unor investigații suplimentare. Examinarea de celule suplimentare (dacă este cazul) sau repetarea experimentului folosind posibile condiții experimentale modificate [de exemplu, intervale dintre concentrații, alte condiții de activare metabolică (și anume, concentrație S9 sau origine S9)] ar putea fi utile.

În cazuri rare, chiar și după efectuarea de investigații suplimentare, setul de date va exclude posibilitatea unei concluzii de rezultate pozitive sau negative și, prin urmare, răspunsul substanței chimice de testat va fi stabilit ca fiind echivoc.

O creștere a numărului de celule poliploide poate să indice faptul că substanțele chimice de testat au potențialul să inhibe procesele mitotice și să producă aberații cromozomiale numerice (52). O creștere a numărului de celule cu cromozomi endoreduplicați poate să indice faptul că substanțele chimice de testat au potențialul de a inhiba progresul ciclului celular (53) (54) (a se vedea punctul 2). Prin urmare, incidența celulelor poliploide și a celulelor cu cromozomi endoreduplicați se înregistrează separat.

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat:

- sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile;
- stabilitatea substanței chimice de testat, dacă este cunoscută;
- solubilitatea și stabilitatea substanței de testat în solvent, dacă sunt cunoscute;
- măsurarea pH-ului, a osmolalității și a precipitatului în mediul de cultură în care s-a adăugat substanța chimică de testat, după caz.

Substanță monocomponentă:

- aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;
- identificare chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS, codul SMILES sau InChI, formula structurală, puritatea, identitatea impurităților chimice, după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic, etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

- în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Solvent:

- justificarea alegerii solventului.
- se indică, de asemenea, procentul de solvent în mediul final de cultură.

Celule:

- tipul și sursa celulelor;
- caracteristicile cariotipului și motivul alegerii celulelor utilizate;
- absența micoplasmei, pentru liniile celulare;
- pentru liniile celulare, informații privind durata ciclului celular, timpul de dublare sau indicele de proliferare;
- sexul donatorilor de sânge, vârsta și orice altă informație relevantă cu privire la donator, sângele integral sau limfocitele separate, mitogenul utilizat;
- numărul de pasaje, dacă este disponibil, pentru liniile celulare;
- metode de întreținere a culturilor celulare, pentru liniile celulare;
- numărul modal de cromozomi, pentru liniile celulare.

Condițiile de testare:

- identitatea substanței chimice de inhibare a metafazei, concentrațiile acesteia și timpul de expunere a celulelor;
- concentrația substanței chimice de testat, exprimată în concentrație finală în mediu de cultură (de exemplu, μg sau mg/ml sau mM din mediul de cultură);
- justificarea selectării concentrațiilor și a numărului de culturi, inclusiv, de exemplu, datele de citotoxicitate și limitele de solubilitate;
- compoziția mediului, concentrația de CO_2 , dacă este cazul, gradul de umiditate;
- concentrația (și/sau volumul) de solvent și substanță chimică de testat adăugate în mediul de cultură;
- temperatura de incubare;
- timpul de incubare;
- durata tratamentului;
- perioada de recoltare după tratament;
- densitatea celulară la momentul însămânțării, dacă este cazul;
- tipul și compoziția sistemului de activare metabolică (sursa fracției S9, metoda de preparare a amestecului S9, concentrația și volumul amestecului S9 și fracția S9 în mediul final de cultură, controalele de calitate ale fracției S9);
- substanțe chimice martor pozitive și negative, concentrații finale pentru fiecare dintre condițiile de tratament;
- metode de preparare a lamelor și tehnica de colorare utilizată;
- criteriile pentru acceptarea testelor;
- criteriile pentru examinarea aberațiilor;
- numărul de celule în metafază analizate;
- metodele de măsurare a citotoxicității;
- orice alte informații suplimentare cu privire la citotoxicitate și metoda utilizată;
- criteriile conform cărora un studiu poate fi considerat ca fiind pozitiv, negativ sau echivoc;
- metode utilizate pentru a determina pH-ul, osmolalitatea și precipitarea.

Rezultate:

- numărul celulelor tratate și numărul de celule recoltate pentru fiecare cultură în cazul în care se folosesc linii celulare;
- măsurători ale citotoxicității, de exemplu, RPD, RICC, MI, alte observații dacă este cazul;
- informații privind durata ciclului celular, timpul de dublare sau indicii de proliferare în cazul liniilor celulare;
- semne de precipitare și ora determinării;
- definirea aberațiilor, inclusiv a lacunelor;
- numărul de celule examinate, numărul de celule care prezintă aberații cromozomiale și tipul aberațiilor cromozomiale, prezentate separat pentru fiecare cultură tratată și cultură martor, incluzând și excluzând lacunele;
- variațiile ploidiei (celule poliploide și celule cu cromozomi endoreduplicați avute în vedere separat) în cazul în care există;
- relația concentrație-răspuns, dacă este posibil;
- date (concentrație și solvenți) privind martorii negativi (solvent) și pozitivi testați în paralel;
- date privind martorii negativi testați anterior (solvenți) și pozitivi, cu intervale, valori medii și deviații standard și limite de control de 95 % pentru distribuție, precum și numărul de date;
- analize statistice, valorile P, dacă este cazul.

*Discutarea rezultatelor.**Concluzii.*

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Evans, H.J. (1976), „Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens”, în *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London, p. 1-29
- (3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), „The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture” în *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. et al. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, p. 427-432.
- (4) Galloway, S.M. et al. (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, p. 1-175.
- (5) Muehlbauer, P.A. et al. (2008), „Improving dose selection and identification of aneugens in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, p. 318-327.
- (6) Capitolul B.49 din prezenta anexă: *Testul in vitro de micronuclei pe celule de mamifere*.
- (7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.
- (8) Scott, D. et al. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, p. 147-204.

-
- (9) Morita, T. *et al.* (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, p. 297-305.
- (10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 8/6, p. 789-886.
- (11) Long, L.H. *et al.* (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/1-2, p. 177-183.
- (12) Nessler, F. *et al.* (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, p. 439-452.
- (13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, p. 191-201.
- (14) Kirkland, D. *et al.* (2005), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, p. 1-256.
- (15) Greenwood, S. *et al.* (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, p. 36-44.
- (16) Hilliard, C.A. *et al.* (1998), Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, p. 316-326.
- (17) Hedner K. *et al.* (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, p. 305-309.
- (18) Ramsey M.J. *et al.* (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, p. 95-106.
- (19) Coecke S. *et al.* (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, p. 261-287.
- (20) Henderson, L. *et al.* (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, p.163-167.
- (21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, p. 347-363.
- (22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, p. 173-215.
- (23) Natarajan, A.T. *et al.* (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Research*, Vol. 37/1, p. 8390.
- (24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, p. 277-290.
- (25) Ong, T.-m. *et al.* (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, p. 55-65.

- (26) Elliot, B.M. *et al.* (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, p. 175-177.
- (27) Matsushima, T. *et al.* (1976), „A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems”, in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al.* (eds.), Elsevier, North-Holland, p. 85-88.
- (28) Galloway, S.M. *et al.* (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, p. 241-261.
- (29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28/1, p. 51-59.
- (30) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Disponibil la adresa: <http://www.pops.int/>.
- (31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, p. 225-8.
- (32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids”, în *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, p. 91-103.
- (33) Zamora, P.O. *et al.* (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, p. 795-801.
- (34) Asakura, M. *et al.* (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, p. 122-130.
- (35) Lorge, E. *et al.* (2008), compararea diferitelor metode pentru realizarea unei evaluări precise a citotoxicității, pe testul micronucleelor *in vitro*. I. Theoretical aspects, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 655/1-2, p. 1-3.
- (36) Galloway, S. *et al.* (2011), Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, p. 77-83.
- (37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, p. 86-87.
- (38) Richardson, C. *et al.* (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, p. 141-154.
- (39) OECD (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Disponibil la cerere
- (40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, p. 32-56.
- (41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis*, Vol. 54/1, p. 36-43.

- (42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, <http://www.epa.gov/opptintr/newchemicals/pubs/uvcb.txt>.
- (43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Disponibil la adresa: <https://federalregister.gov/a/2012-13774>.
- (44) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS)”, Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.
- (45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.
- (46) Scott, D. *et al.* (1990), „Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*”, in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, p. 62-86.
- (47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, p. 87-90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.
- (49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.
- (50) Galloway, S.M. *et al.* (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, p. 1-175.
- (51) Richardson, C. *et al.* (1989), „Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays”, in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, p. 141-154.
- (52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, Vol. 287/1, p. 2946.
- (53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, p. 403-413.
- (54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, p. 1362-1364.
- (55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 312, p. 139-149.
-

Apendicele 1

DEFINIȚII

Aneuploidie: orice deviere de la numărul diploid (sau haploid) normal de cromozomi, cu unul sau mai mulți cromozomi, dar nu cu un set (seturi) întreg (întregi) de cromozomi (poliploidie).

Apoptoză: moarte celulară programată caracterizată printr-o succesiune de etape conducând la dezintegrarea celulelor în particule membranare care sunt apoi eliminate prin fagocitoză sau excreție.

Proliferare celulară: creșterea numărului de celule ca rezultat al diviziunii celulare mitotice.

Substanță chimică: o substanță sau un amestec.

Ruptură cromatidică: discontinuitatea unei singure cromatide care prezintă în mod clar o eroare de aliniere a cromatidelor.

Lacună cromatidică: regiune necolorată (leziune acromatică) a unei singure cromatide în care există o eroare minimă de aliniere a cromatidei.

Aberație de tip cromatidic: o leziune structurală a cromozomului care se traduce prin ruptura cromatidelor singure sau prin ruptura și alipirea între cromatide.

Aberație de tip cromozomial: o leziune structurală a cromozomului care se traduce prin ruptura sau ruptura și reuniunea ambelor cromatide în același loc.

Clastogen: orice substanță chimică care cauzează aberații cromozomiale structurale în populații de celule sau organisme eucariote.

Concentrații: se referă la concentrații finale ale substanței chimice de testat în mediul de cultură.

Citotoxicitate: Pentru testele prevăzute în această metodă de testare utilizând linii celulare, citotoxicitatea este identificată ca o reducere a dublării relative a populației (RPD) sau creșterea relativă a numărului de celule (RICC) a celulelor tratate în comparație cu martorul negativ (a se vedea punctul 17 și apendicele 2). Pentru testele prevăzute în această metodă de testare utilizând culturi primare de limfocite, citotoxicitatea este identificată ca o reducere a indexului mitotic (MI) a celulelor tratate în comparație cu martorul negativ (a se vedea punctul 18 și apendicele 2).

Enderoduplicare: proces în care, după o perioadă S de replicare a ADN-ului, nucleul nu intră în mitoză, ci începe o altă perioadă S. Rezultă cromozomi cu 4, 8, 16, ... cromatide.

Genotoxic: termen general cuprinzând toate tipurile de leziuni ale ADN-ului sau ale cromozomilor, inclusiv rupturi, deleții, aducții, modificări și legături nucleotidice, rearanjări, mutații ale genelor, aberații cromozomiale și aneuploidie. Nu toate tipurile de efecte genotoxice au drept rezultat mutații sau leziuni cromozomiale stabile.

Indice mitotic (MI): numărul celulelor în metafază împărțit la numărul total de celule observate într-o populație de celule; indică gradul de proliferare a populației respective.

Mitoză: divizarea nucleului celular, în general, descompus în profază, prometafază, metafază, anafază și telofază.

Mutagen: agent care produce o modificare ereditară uneia sau mai multor secvențe de perechi de bază de ADN genic sau structurii cromozomilor (aberații cromozomiale).

Aberație numerică: modificare a numărului de cromozomi față de numărul normal caracteristic pentru celulele utilizate.

Poliploidie: aberații cromozomiale numerice în celule sau organisme implicând unul sau mai multe seturi întregi de cromozomi, spre deosebire de unul sau mai mulți cromozomi izolați (aneuploidie).

Status p53: proteina p53 este implicată în reglementarea circuitului de celule, apoptoză și regenerare a ADN-ului. Celulele cu deficit de proteină funcțională p53, aflate în imposibilitatea de a inhiba ciclul celular sau de a elimina celulele deteriorate prin intermediul apoptozei sau al altor mecanisme (de exemplu, inducția de regenerare de ADN) relaționate cu funcțiile p53 ca răspuns la deteriorarea ADN-ului, sunt teoretic mai predispuse la mutații ale genelor sau aberații cromozomiale.

Creșterea relativă a numărului de celule (RICC): creșterea numărului de celule în culturile expuse la substanța chimică față de creșterea în culturile netratate, un raport exprimat ca procent.

Dublarea relativă a populației (RPD): creșterea numărului de dublări ale populației în culturile expuse la substanța chimică față de creșterea în culturile netratate, un raport exprimat ca procent.

Fracția S9 a ficatului: supernatant din ficat omogenizat după centrifugare la 9 000 g, și anume extract din ficat crud.

Amestecul S9: amestecul dintre fracția S9 a ficatului și cofactorii necesari pentru activitatea metabolică a enzimelor.

Martor solvent: termen general pentru a defini culturile martor care primesc solventul singur utilizat pentru a dizolva substanța chimică de testat.

Aberație structurală: modificare a structurii cromozomilor, detectabilă la examinarea microscopică a celulelor în stadiul de metafază al diviziunii acestora, care se prezintă sub formă de deleții și fragmente, modificări intracromozomiale și intercromozomiale.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat în cadrul acestei metode de testare.

Martori netratați: culturi care nu beneficiază de niciun tratament (și anume, nicio substanță chimică de testat sau solvent), dar care sunt prelucrate în mod simultan în același mod precum culturile care primesc substanța chimică de testat.

Apendicele 2

FORMULE PENTRU EVALUAREA CITOTOXICITĂȚII

Indice mitotic (MI):

$$MI(\%) = \frac{\text{Număr de celule mitotice}}{\text{Număr total de celule examinate}} \times 100$$

Se recomandă **creșterea relativă a numărului de celule (RICC)** sau **dublarea relativă a populației (RPD)**, întrucât ambele iau în considerare proporția de celule care au efectuat o diviziune celulară.

$$RICC(\%) = \frac{(\text{Creșterea numărului de celule în culturile tratate (la final-la început)})}{(\text{Creșterea numărului de celule în culturile martor (la final-la început)})} \times 100$$

$$RPD(\%) = \frac{(\text{Nr. de dublări de populație în culturile tratate})}{(\text{Nr. de dublări de populație în culturile martor})} \times 100$$

unde:

Dublarea populației = $[\log (\text{numărul de celule post-tratament} \div \text{numărul inițial de celule})] \div \log 2$

De exemplu, o RICC sau o RPD de 53 % indică 47 % citotoxicitate/citostază și 55 % citotoxicitate/citostază măsurată prin MI, însemnând că MI este 45 % din martor.

În orice caz, se măsoară numărul de celule înainte de tratament, iar același lucru se efectuează atât pentru culturile tratate, cât și pentru cele martor negative.

În timp ce RICC (și anume, numărul de celule în culturile tratate/numărul de celule în culturile martor) a fost utilizată ca parametru de citotoxicitate în trecut, aceasta nu mai este recomandată deoarece poate subestima citotoxicitatea.

În culturile martor negative, dublarea populației trebuie să fie compatibilă cu cerința prelevării de probe a celulelor după tratament la un interval de timp egal cu de 1,5 ori durata ciclului celular normal și indicele mitotic trebuie să fie destul de crescut pentru a obține un număr suficient de celule în mitoză și pentru a calcula într-un mod fiabil o reducere de 50 %.”

- (4) În partea B, capitolul B.11 se înlocuiește cu următorul text:

„B.11 Test de aberație cromozomială în măduva osoasă de mamifere

INTRODUCERE

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea nr. 475 a OCDE (2016). Acesta face parte dintr-o serie de metode de testare privind toxicologia genetică. A fost elaborat un document al OCDE care oferă informații succinte privind testarea pentru toxicologia genetică (1) și care trece în revistă modificările efectuate recent asupra orientărilor respective.

Testul *in vivo* de aberație cromozomială pe măduva osoasă de mamifere este relevant în special pentru evaluarea genotoxicității deoarece, în pofida faptului că pot varia între specii, factorii de metabolism *in vivo*, farmacocinetica și procesele de regenerare de ADN sunt active și contribuie la răspunsuri. Un test *in vivo* este util, de asemenea, pentru investigarea suplimentară a genotoxicității detectate de un sistem *in vitro*.

Testul *in vivo* de aberație cromozomială la mamifere este utilizat pentru detectarea aberațiilor cromozomiale provocate de substanțele chimice de testat în structura celulelor din măduva osoasă a mamiferelor, de regulă, rozătoare (2) (3) (4) (5). Aberații cromozomiale structurale pot fi de două tipuri, cromozomiale sau cromatidice. În timp ce majoritatea aberațiilor induse prin substanța chimică sunt de tip cromatidic, se produc, de asemenea, aberații de tip cromozomial. Leziunile cromozomiale și fenomenele conexe sunt cauza multor maladii genetice umane și există dovezi substanțiale că, atunci când aceste leziuni și fenomene conexe provoacă modificări ale oncogenelor și ale genelor supresoare de tumori, acestea sunt implicate în inducerea cancerului la oameni și în sistemele experimentale. Poliploidia (inclusiv endoreduplicarea) ar putea apărea în testele *in vivo* de aberație cromozomială. Cu toate acestea, o creștere a numărului de celule poliploide în sine nu indică potențial aneugenic și poate indica pur și simplu perturbarea ciclului celular sau citotoxicitate. Acest test nu este conceput pentru a măsura aneuploidia. Un test *in vivo* de micronucleu pe eritrocite de mamifere (capitolul B.12 din prezenta anexă) sau testul *in vitro* de micronucleu pe celule de mamifere (capitolul B.49 din prezenta anexă) ar fi testele *in vivo* și, respectiv, *in vitro* recomandate pentru detectarea aneuploidiei.

Definiții ale terminologiei utilizate sunt prevăzute în apendicele 1.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

Rozătoarele sunt utilizate în mod obișnuit în acest test, dar utilizarea altor specii poate fi adecvată în unele cazuri, dacă este justificată din punct de vedere științific. Țesutul-țintă în acest test este măduva osoasă, întrucât este un țesut puternic și conține o populație de celule cu ciclu rapid care se pot izola și prelucra ușor. Justificarea din punct de vedere științific a utilizării altor specii decât șobolanii și șoarecii se indică în raport. În cazul în care sunt utilizate alte specii decât rozătoarele, se recomandă ca măsurarea aberației cromozomiale în măduva osoasă să fie integrată în alt test de toxicitate corespunzător.

În cazul în care există dovezi că substanța (substanțele) chimică(e) de testat sau metabolitul (metaboliții) acesteia nu vor ajunge la țesutul țintă, este posibil ca utilizarea acestui test să nu fie potrivită.

Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare specific, se examinează dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare în cazul în care există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Animalele sunt expuse la substanța chimică de testat printr-o cale de expunere corespunzătoare și sunt eutanasiate în condiții umane la momentul corespunzător după tratament. Înainte de eutanasiere, animalele se supun tratamentului cu un agent de inhibare a metafazei (de exemplu, colchicină sau colcemid). Ulterior, din celulele de măduvă osoasă se realizează preparate cromozomiale care se colorează și celulele în metafază se examinează pentru a pune în evidență aberațiile cromozomiale.

VERIFICAREA COMPETENȚEI LABORATORULUI

Verificări de competență

Pentru a stabili experiența suficientă în efectuarea testului înainte de a-l utiliza pentru testele de rutină, laboratorul trebuie să fi demonstrat capacitatea de a reproduce rezultatele așteptate în urma informațiilor publicate [de exemplu, (6)] pentru frecvențe de aberații cromozomiale cu un minim de două substanțe chimice martor pozitive (inclusiv răspunsurile slabe cauzate de doze scăzute de martori pozitivi) precum cele enumerate în tabelul 1 și cu martori vehicul/solvent compatibili (a se vedea punctul 22). Aceste experimente utilizează doze care produc creșteri reproductibile și legate de doză și demonstrează sensibilitatea și gama dinamică a sistemului de testare în țesutul de interes (măduva osoasă) utilizând metoda de examinare care urmează să fie utilizată în cadrul laboratorului. Această cerință nu se aplică laboratoarelor care au experiență, și anume, cele care dețin o bază de date anterioare disponibilă astfel cum este definit la punctele 10-14.

Date privind martorii testați anterior

Pe parcursul verificărilor de competență, laboratorul trebuie să stabilească:

- o plajă de valori și o distribuție a martorilor pozitivi testați anterior, precum și
- o plajă de valori și o distribuție a martorilor negativi testați anterior.

La obținerea primelor date pentru o distribuție a martorilor negativi testați anterior, martorii negativi testați în paralel trebuie să fie în concordanță cu datele publicate referitoare la martori, în cazul în care acestea există. Pe măsură ce tot mai multe date experimentale se adaugă la distribuția martorilor testați anterior, martorii negativi testați în paralel trebuie să fie, în mod ideal, de până la 95 % din limitele de control ale respectivei distribuții. Baza de date privind martorii negativi testați anterior trebuie să fie solidă din punct de vedere statistic pentru a asigura capacitatea laboratorului de a evalua distribuția datelor sale privind martorii negativi. Referințele bibliografice sugerează că poate fi necesar un minim de 10 experimente, dar ar trebui, de preferință, ca baza de date să fie constituită din cel puțin 20 experimente efectuate în conformitate cu condiții experimentale comparabile. Laboratoarele trebuie să utilizeze metode de control al calității, cum ar fi grafice de control [de exemplu, diagrame C sau X-bar (7)], pentru a identifica gradul de variabilitate al datelor lor și pentru a dovedi faptul că metodologia se află „sub control” în respectul laborator. Referințele bibliografice prezintă recomandări suplimentare privind modalitatea în care se pot construi și utiliza datele anterioare (și anume, criteriile de includere și de excludere a datelor în datele istorice și criteriile de acceptabilitate pentru un anumit experiment) (8).

În cazul în care laboratorul nu completează un număr suficient de experimente pentru a stabili o distribuție a martorilor negativi solidă din punct de vedere statistic (a se vedea punctul 11) în timpul verificărilor de competență (descrise la punctul 9), se acceptă posibilitatea elaborării distribuției în timpul primelor teste de rutină. Această abordare trebuie să respecte recomandările stabilite în referințele bibliografice (8), iar rezultatele martorilor negativi obținute în aceste experimente trebuie să rămână în conformitate cu datele publicate cu privire la martorii negativi.

Orice modificare la protocolul experimental se ia în considerare în ceea ce privește impactul acestuia asupra datelor rezultate, care trebuie să fie în conformitate cu baza de date existentă privind martorii testați anterior a laboratorului. Doar inconsecvențele majore conduc la stabilirea unei noi baze de date privind martorii testați anterior, în cazul în care opiniile experților stabilesc faptul că acestea diferă față de distribuția anterioară (a se vedea punctul 11). În timpul procesului de restabilire, o bază completă de date cu privire la martorii negativi nu este neapărat necesară pentru a permite efectuarea unui test propriu-zis, cu condiția ca laboratorul să poată demonstra că valorile martor negative ale acestuia rămân consecvente fie cu bazele de date anterioare aferente, fie cu datele publicate corespunzătoare.

Datele cu privire la martorii negativi trebuie să cuprindă incidența aberațiilor cromozomiale structurale (cu excepția lacunelor) pentru fiecare animal. Martorii negativi testați în paralel trebuie să fie, în mod ideal, de până la 95 % din limitele de control ale distribuției bazei de date privind martorii negativi testați în paralel a laboratorului. În cazul în care datele privind martorii negativi testați în paralel se situează în afara limitelor de control de 95 %, acestea pot fi acceptabile pentru a fi incluse în distribuția de martori testați anterior în măsura în care datele respective nu reprezintă valori aberante extreme și există dovezi că sistemul de testare se află „sub control” (a se vedea punctul 11) și că nu s-au înregistrat defecțiuni tehnice sau umane.

DESCRIEREA METODEI**Preparate***Selectarea speciilor de animale*

Se utilizează șușe utilizate în mod curent în laborator, alegându-se animale adulte, tinere, sănătoase. Se utilizează, de regulă, șobolani, cu toate că se pot utiliza și șoareci. Orice altă specie adecvată de mamifere poate fi utilizată, în cazul în care se furnizează justificarea științifică în raport.

Condiții de adăpostire și de hrănire a animalelor

În cazul rozătoarelor, temperatura sălii în care se află animalele trebuie să fie de 22 °C ($\pm$ 3 °C). Cu toate că umiditatea relativă este, în mod ideal, de 50-60 %, aceasta trebuie să fie de cel puțin 40 % și să nu depășească, de preferință, 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Spațiul se iluminează artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Alegerea regimului alimentar poate fi influențată de necesitatea de a asigura o proporție adecvată a substanței chimice de testat în cazul administrării prin această metodă. Rozătoarele se adăpostesc în grupuri mici (cel mult cinci pentru fiecare cușcă) de același sex și grup supus tratamentului, în cazul în care nu se preconizează niciun comportament agresiv, de preferință în cuști cu pardoseală solidă cu îmbogățire adecvată a mediului de viață. Animalele pot fi adăpostite individual în cazul în care acest lucru este justificat din punct de vedere științific.

Pregătirea animalelor

Se utilizează în mod normal animale adulte, tinere, sănătoase (pentru rozătoare, de preferință, de 6-10 săptămâni la începutul tratamentului, deși animale puțin mai în vârstă sunt, de asemenea, acceptabile), care sunt distribuite în mod aleatoriu în grupe martor și grupe de tratament. Animalele sunt identificate individual prin utilizarea unei metode umane, foarte puțin invazive (de exemplu, prin marcarea cu inele, crotaliere, microcipare sau identificare biometrică, dar nu prin secționarea urechii sau a degetului) și sunt aclimatizate la condițiile de laborator timp de minimum cinci zile. Cuștile se dispun astfel încât posibilele efecte datorate amplasării în cușcă să fie reduse la minim. Se evită contaminarea încrucișată dintre martorul pozitiv și substanța chimică de testat. La începutul studiului, greutatea animalelor trebuie să prezinte o variație minimă și să nu depășească $\pm$ 20 % din greutatea medie a fiecărui sex.

Pregătirea dozelor

Substanțele de testat în stare solidă se dizolvă sau se pun în suspensii în solvenți sau vehicule corespunzătoare sau se amestecă în alimente sau în apa de băut înainte de a fi administrate animalelor. Substanțele chimice de testat în stare lichidă se pot administra direct sau se pot dilua înainte de administrare. Pentru expunerile prin inhalare, substanțele chimice de testat pot fi administrate sub formă de gaz, vapori sau aerosol solid/lichid, în funcție de proprietățile fizico-chimice ale acestora. Se utilizează preparate proaspete de substanță chimică de testat, cu excepția cazului în care datele de stabilitate demonstrează caracterul acceptabil al stocării și definesc condițiile de stocare corespunzătoare.

Solvent/vehicul

Solventul/vehiculul nu trebuie să producă efecte toxice la volumele de doză utilizate și nu trebuie să existe suspiciunea reacției chimice a acestuia cu substanțele chimice de testat. În cazul în care se utilizează alți solvenți/vehicule decât cei recunoscuți, includerea acestora trebuie să fie justificată cu date de referință care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare mai întâi utilizarea unui solvent/vehicul apos. Exemple de solvenți/vehicule compatibili utilizați în mod obișnuit includ apa, soluția fiziologică salină, soluția de metilceluloză, soluția de carboximetilceluloză sare de sodiu, uleiul de măsline și uleiul de porumb. În absența unor date anterioare sau publicate cu privire la martori care să ateste faptul că nicio aberație cromozomială de structură sau alte efecte vătămătoare nu sunt induse de un anumit solvent/vehicul atipic, se efectuează un studiu inițial pentru a stabili acceptabilitatea martorului tratat cu solvent/vehicul.

Martori*Martori pozitivi*

Pentru fiecare test se include, în mod normal, un grup de animale tratate cu o substanță chimică martor pozitivă. Acest lucru poate fi eliminat în cazul în care laboratorul de testare a demonstrat competență în efectuarea testului și a stabilit un interval de martori pozitivi anteriori. În cazul în care nu este inclus un grup de martori pozitivi testați în paralel, în fiecare experiment se includ martori examinați (lame fixate și necolorate). Aceștia pot fi obținuți prin includerea în sistemul de examinare a studiului de probe de referință adecvate care au fost obținute și păstrate în urma unui experiment separat cu martori pozitivi efectuat periodic (de exemplu, la fiecare 6-18 luni) în cadrul laboratorului în care se efectuează testul, de exemplu, în timpul testărilor de competență și ulterior în mod regulat, dacă este necesar.

Substanțele chimice martor pozitive trebuie să producă în mod fiabil o creștere detectabilă în ceea ce privește frecvența celulelor cu aberații cromozomiale structurale față de nivelul spontan. Dozele de martor pozitiv se aleg astfel încât să se obțină efecte clare, dar fără a releva imediat examinătorului identitatea probelor codate. Pentru martorul pozitiv, se poate accepta administrarea pe o cale diferită față de cea utilizată în cazul substanței chimice de testat, folosind o schemă de tratament diferită și o singură prelevare de probe. În plus, utilizarea de martori pozitivi din aceeași clasă de substanțe chimice poate fi luată în considerare, după caz. Tabelul 1 include exemple de substanțe chimice martor pozitive.

Tabelul 1.

Exemple de substanțe chimice martor pozitive

Substanță chimică	Nr. CAS
Metansulfonat de etil	62-50-0
Metansulfonat de metil	66-27-3
Etil nitrozouree	759-73-9
Mitomycină C	50-07-7
Ciclofosamidă (monohidrat)	50-18-0 (6055-19-2)
Trietilenmelamină	51-18-3

Martori negativi

Animalele din grupul martor negativ se iau în considerare la fiecare prelevare de probe și se manipulează de altfel în aceeași modalitate ca grupurile tratate, cu excepția faptului că nu beneficiază de tratamentul cu substanța chimică de testat. În cazul în care un solvent/vehicul este utilizat pentru administrarea substanței chimice de testat, acesta se administrează grupului martor. Cu toate acestea, în cazul în care coerența variabilității inter-animale și frecvențele celulelor cu aberații structurale sunt demonstrate de datele privind martorii negativi testați anterior la fiecare prelevare de probe efectuată de laboratorul de testare, ar putea fi necesară o singură prelevare de probe pentru martorul negativ. În cazul în care se utilizează o singură prelevare de probe pentru martorii negativi, aceasta trebuie să fie prima prelevare de probe utilizată în cadrul studiului.

PROCEDURĂ

Numărul și sexul animalelor

În general, reacția de micronucleu este similară între masculi și femele (9) și se preconizează că acest lucru va fi valabil, de asemenea, pentru aberațiile cromozomiale structurale; prin urmare, majoritatea studiilor pot fi efectuate pe oricare dintre sexe. Date care demonstrează diferențe relevante între masculi și femele (de exemplu, diferențele în materie de toxicitate sistemică, metabolism, biodisponibilitate, toxicitate în măduva osoasă, etc., inclusiv, de exemplu, un studiu de stabilire a dozelor) ar încuraja utilizarea ambelor sexe. În acest caz, ar fi adecvat să se efectueze un studiu în cazul ambelor sexe, de exemplu, ca parte a unui studiu de toxicitate cu doză repetată. Utilizarea modelului factorial poate fi adecvată în cazul în care sunt utilizate ambele sexe. Apendicele 2 prezintă detalii cu privire la modul de analiză a datelor care utilizează acest model.

Dimensiunea grupurilor la începerea studiului se stabilește cu scopul de a furniza pentru fiecare grup cel puțin 5 animale analizabile de același sex sau din fiecare sex, în cazul în care sunt utilizate ambele sexe. În cazul în care expunerea umană la substanțe chimice este specifică unui anumit sex, cum ar fi, de exemplu, în cazul unor produse farmaceutice, testul se efectuează utilizând sexul corespunzător. Ca o orientare pentru cerințe maxime tipice animalelor, un studiu pe măduva osoasă din două prelevări de probe cu trei grupuri de dozaj și un grup martor negativ testat în paralel, la care se adaugă un grup martor pozitiv (fiecare grup alcătuit din cinci animale de același sex) ar necesita 45 de animale.

Doze

În cazul în care se efectuează un studiu preliminar de stabilire a dozelor deoarece nu există date adecvate disponibile pentru a contribui la selectarea dozei, acesta se realizează în același laborator, utilizând aceeași specie, sușă, sex și regim de tratament precum cele care urmează să fie utilizate în studiul principal (10). Studiul are ca obiectiv identificarea dozei maxime tolerate (DMT), definită drept doza cea mai ridicată care va fi tolerată fără dovezi de toxicitate care să limiteze studiul, în funcție de durata perioadei de studiu [de exemplu, prin reducerea greutateii corporale sau a citotoxicității sistemului hematopoietic, dar nu deces sau semne de durere, suferință sau stres care să necesite eutanasiere în condiții umane (11)].

Doza maximă mai poate fi definită ca doza care produce unele semne de toxicitate în măduva osoasă.

Substanțele chimice care prezintă saturație a proprietăților toxicocinetice sau provoacă procese de detoxifiere care pot conduce la o diminuare a expunerii după un tratament pe termen lung pot reprezenta excepții de la criteriile de stabilire a dozelor și se evaluează de la caz la caz.

Pentru a obține informații privind relația doză-răspuns, un studiu complet trebuie să includă un grup martor negativ și un minim de trei niveluri de doze separate, în general, de un factor de 2, dar nu mai mult de 4. În cazul în care substanța chimică de testat nu produce toxicitate într-un studiu de stabilire a dozelor sau pe baza datelor existente, doza maximă pentru o singură administrare este de 2 000 mg/kg greutate corporală. Cu toate acestea, în cazul în care substanța chimică de testat provoacă toxicitate, DMT trebuie să fie cea mai mare doză administrată, iar dozele utilizate trebuie, de preferat, să acopere un interval de toxicitate de la doza maximă până la o doză care provoacă toxicitate minimă sau nu provoacă toxicitate. În cazul în care se observă toxicitate în țesutul țintă (măduva osoasă) la toate dozele testate, se recomandă efectuarea unui studiu suplimentar la doze netoxice. Studiile care au ca scop caracterizarea pe deplin a informațiilor cantitative doză-răspuns pot solicita grupuri suplimentare de doze. Pentru anumite tipuri de substanțe chimice de testat (de exemplu, produsele farmaceutice umane) reglementate prin cerințe specifice, aceste limite pot varia.

Test limită

În cazul în care experimentele pentru stabilirea intervalului sau datele existente legate de sușele de animale indică faptul că un regim de tratament de cel puțin doza limită (descrisă mai jos) nu produce efecte toxice detectabile, (inclusiv nicio diminuare a proliferării măduvei osoase sau alte semne de citotoxicitate în țesutul țintă) și în cazul în care genotoxicitatea este improbabilă pe baza studiilor *in vitro* de genotoxicitate sau a datelor provenite de la substanțele chimice cu o structură apropiată, atunci este posibil ca un studiu integral cu trei doze de niveluri diferite să nu fie considerat necesar dacă s-a demonstrat că substanța (substanțele) chimică(e) de testat ajung(e) la țesutul țintă (măduva osoasă). În astfel de cazuri, un singur nivel de doză, la doza limită, poate fi suficient. Pentru o perioadă de administrare > 14 zile, doza limită este de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi. Pentru perioadele de administrare de 14 zile sau mai puțin, doza limită este de 2 000 mg/kg greutate corporală/zi.

Administrarea dozelor

La elaborarea unui test se ia în considerare calea anticipată de expunere umană. Prin urmare, căile de expunere precum alimentația, apa potabilă, expunerea locală, subcutanată, intravenoasă, calea orală (prin gavaj), inhalarea, expunerea intratraheală sau implantarea pot fi alese după caz. În orice caz, calea trebuie aleasă pentru a asigura expunerea adecvată a țesutului (țesuturilor) țintă. Injectarea peritoneală nu este recomandată, în general, deoarece nu este o cale destinată expunerii umane și se utilizează doar cu anumite justificări științifice. În cazul în care substanța chimică de testat este administrată în amestec cu hrana sau apa potabilă, în special în cazul administrării unice, se acordă atenție deosebită intervalului dintre consumul de hrană și apă și prelevarea de probe, care trebuie să fie suficient pentru a permite identificarea efectelor (a se vedea punctele 33-34). Volumul maxim de lichid care se poate administra prin sondă gastrică sau prin injecție într-o singură repriză depinde de dimensiunea animalului de laborator. Volumul nu trebuie să depășească, în mod normal, 1 ml/100 g greutate corporală, exceptând cazul soluțiilor apoase, când se poate administra un maxim de 2 ml/100 g. Utilizarea unor volume mai mari decât cele menționate se justifică. Exceptând substanțele chimice de testat iritante sau corozive, care vor prezenta, în mod normal, efecte exacerbate la concentrații mai mari, variația volumului testat se reduce la minim prin ajustarea concentrației, astfel încât să se asigure administrarea unui volum constant în raport cu greutatea corporală pentru toate dozele.

Schema de tratament

Substanțele chimice de testat se administrează, în mod normal, o singură dată, dar se pot administra, de asemenea, în doză fracționată (și anume, două sau mai multe tratamente în aceeași zi la distanță de doar 2-3 ore) pentru a facilita administrarea unui volum mare. În aceste circumstanțe sau atunci când substanța chimică de testat este administrată prin inhalare, momentul de prelevare de probe trebuie programat în funcție de ultima administrare a dozei sau de sfârșitul expunerii.

Există puține date disponibile cu privire la gradul de adecvare al unui protocol cu doză repetată pentru efectuarea acestui test. Cu toate acestea, în cazurile în care se dorește integrarea acestui test cu un test de toxicitate la doze repetate, se acordă atenție deosebită pentru a evita pierderea de celule mitotice cu leziuni cromozomiale astfel cum se întâmplă cu doze toxice. O astfel de integrare este acceptabilă în cazul în care doza maximă este mai mare sau egală cu doza limită (a se vedea punctul 29) și la un grup de doze se administrează doza limită pe durata perioadei de tratament. Testul pe micronucleu (metoda de testare B.12) se consideră testul *in vivo* agreat pentru aberații cromozomiale în cazul în care se dorește integrarea cu alte studii.

Se efectuează prelevarea de probe de măduva osoasă în două momente diferite în urma tratamentelor unice. Pentru rozătoare, primul interval de prelevare de probe trebuie să fie perioada necesară pentru a completa de 1,5 ori durata ciclului celular normal (acesta din urmă fiind în mod normal de 12-18 ore după perioada de tratament). Având în vedere faptul că timpul necesar pentru absorbția și metabolizarea substanței (substanțelor) chimice de testat, precum și acțiunea acesteia (acestora) asupra cineticii ciclului celular poate avea efecte asupra timpului optim pentru detectarea aberației cromozomiale, se recomandă să se procedeze la o altă prelevare de probe la 24 de ore după prima prelevare. După prima prelevare de probe, se tratează toate grupurile de doze și se colectează probele pentru analiză; cu toate acestea, la ultima (ultimele) prelevare (prelevări) de probe se administrează doar dozele maxime. În cazul în care sunt utilizate regimuri de dozare de mai mult de o zi pe baza unor justificări științifice, se procedează la o prelevare de probe la un interval de timp de până la de 1,5 ori durata ciclului celular normal după tratamentul final.

După tratament și înainte de colectarea probelor, animalele se injectează intraperitoneal cu o doză corespunzătoare de agent de inhibare a metafazei (de exemplu, colcemid sau colchicină), iar probele sunt colectate ulterior la un interval corespunzător. Intervalul respectiv este de aproximativ 3-5 ore înaintea colectării în cazul șoarecilor și de 2-5 ore pentru șobolani. Celulele se recoltează din măduva osoasă, se umflă, se fixează, se colorează și se analizează pentru aberații cromozomiale (12).

Observații

Se recomandă efectuarea de observații clinice generale asupra animalelor de experiență și înregistrarea semnelor clinice cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași (aceleași) oră (ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrarea dozei. În perioada de administrare a dozei, toate animalele se examinează cel puțin de două ori pe zi pentru a se determina morbiditatea sau mortalitatea. Toate animalele se cântăresc la începutul studiului, cel puțin o dată pe săptămână în timpul studiilor cu doză repetată și la eutanasiere. În cadrul studiilor cu o durată de cel puțin o săptămână, consumul de hrană se măsoară cel puțin săptămânal. În cazul în care substanța chimică de testat este administrată prin apa de băut, consumul de apă se măsoară la fiecare schimbare de apă și cel puțin o dată pe săptămână. Animalele care prezintă indicatori neletali de toxicitate excesivă se eutanasează în condiții umane înainte de încheierea perioadei de testare (11).

Expunerea țesutului țintă

Se prelevează o probă de sânge la momentul (momentele) adecvat(e) pentru de a permite investigarea nivelurilor plasmatică ale substanțelor chimice de testat cu scopul a demonstra faptul că măduva osoasă a fost expusă, acolo unde este cazul și unde nu există alte date de expunere (a se vedea punctul 44).

Măduva osoasă și preparatele cromozomiale

Imediat după eutanasierea în condiții umane, celule de măduvă osoasă se extrag din femurul sau tibia animalelor, se expun la o soluție hipotonică și se fixează. Celulele în metafază se întind apoi pe lame și se colorează prin metodele stabilite (a se vedea punctele 3-12).

Analiză

Toate lamele, inclusiv cele de la martorii pozitivi și negativi, sunt codificate independent înainte de analiză și sunt randomizate astfel încât examinatorul să nu cunoască condiția de tratament.

Se determină indicele mitotic ca o măsură a citotoxicității, pe cel puțin 1000 de celule pe animal pentru toate animalele tratate (inclusiv martorii pozitivi), netratate sau animalele martori negativi tratate cu un vehicul/solvent.

Pentru fiecare animal se analizează cel puțin 200 de celule în metafază pentru a evidenția aberații cromozomiale structurale, incluzând și excluzând lacunele (6). Cu toate acestea, în cazul în care baza de date privind martorii negativi testați anterior indică faptul că valoarea medie a frecvenței aberațiilor cromozomiale structurale de fond este $< 1\%$ în laboratorul de testare, se ia în considerare examinarea de celule suplimentare. Aberațiile de tip cromatidian și cromozomial se înregistrează separat și se clasifică în funcție de subtipuri (rupturi, schimburi). Procedurile utilizate în laborator trebuie să asigure că analiza aberațiilor cromozomiale este efectuată de un personal bine instruit și este supusă unei evaluări inter pares, dacă este cazul. Recunoscând faptul că metodele de preparare a lamelor conduc adesea la scindarea unei fracții de celule în metafază cu pierdere de cromozomi, toate celulele examinate trebuie, prin urmare, să conțină un număr de centromeri nu mai mic de $2n \pm 2$, unde n este numărul haploid de cromozomi pentru specia respectivă.

DATE ȘI RAPORTARE

Prelucrarea rezultatelor

Se recomandă prezentarea sub formă de tabel a datelor pentru fiecare animal. Pentru fiecare animal, se evaluează indicele mitotic, numărul de celule în metafază examinate, numărul de aberații pentru fiecare celulă în metafază și procentul de celule cu aberație (aberații) cromozomială (cromozomiale) structurală (structurale). Diferitele tipuri de aberații cromozomiale structurale se enumeră împreună cu numărul și frecvența acestora pentru grupurile tratate și pentru cele martor. Se înregistrează separat lacunele, precum și celulele poliploide și celulele cu cromozomi endoreduplicați. Se raportează frecvența lacunelor, dar, în general, aceasta nu se include în analiza frecvenței totale a aberațiilor structurale. În cazul în care nu există dovezi privind diferența de răspunsuri între sexe, datele se pot combina pentru analiza statistică. Datele cu privire la toxicitatea animală și semnele clinice trebuie, de asemenea, să fie raportate.

Criterii de acceptabilitate

Următoarele criterii determină acceptabilitatea testului:

- a) Datele privind martorii negativi testați în paralel sunt considerate acceptabile pentru adăugarea la baza de date cu privire la martorii testați anterior (a se vedea punctele 11-14);
- b) Martorii pozitivi testați în paralel sau martorii examinați trebuie să inducă răspunsuri compatibile cu cele provenite din baza de date cu privire la martorii pozitivi testați anterior și să producă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ (a se vedea punctele 20-21);
- c) A fost analizat un număr corespunzător de doze și celule;
- d) Criteriile de selectare a dozei maxime sunt consecvente cu cele descrise la punctele 25-28.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

Cu condiția îndeplinirii tuturor criteriilor de acceptabilitate, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar pozitivă în cazul în care:

- a) cel puțin unul dintre grupurile tratate prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic a frecvenței de celule cu aberații cromozomiale structurale (excluzând lacunele) comparativ cu martorul negativ testat în paralel,
- b) această creștere este raportată la doză cel puțin la un moment de prelevare de probe atunci când este evaluată prin intermediul unui test adecvat de stabilire a tendinței și
- c) oricare dintre aceste rezultate se situează în afara distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limite de control de 95 % pe baza distribuției Poisson).

În cazul în care se analizează doar doza maximă la un anumit moment de prelevare de probe, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar pozitivă în cazul în care există o creștere semnificativă din punct de vedere statistic, comparativ cu martorul negativ testat în paralel, iar rezultatele se situează în afara distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limite de control 95 % pe baza distribuției Poisson). Referințele bibliografice prezintă recomandări privind metode statistice adecvate (13). La efectuarea unei analize a relației doză-răspuns, se analizează cel puțin trei grupuri tratate de doze. Testele statistice utilizează animalul ca unitate experimentală. Rezultatele pozitive ale unui test de aberație cromozomială indică faptul că substanța chimică de testat induce aberații cromozomiale structurale în măduva osoasă a speciei testate.

Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată în mod clar negativă în cazul în care, în toate condițiile experimentale examinate:

- a) Niciuna dintre grupele tratate nu prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic a frecvenței de celule cu aberații cromozomiale structurale (excluzând lacunele) în comparație cu martorul negativ testat în paralel,

- b) Nu există nicio creștere raportată la doză indiferent de momentul prelevării, atunci când este evaluată prin intermediul unui test adecvat de stabilire a tendinței,
- c) Toate rezultatele se situează în interiorul distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limite de control de 95 % pe baza distribuției Poisson) și
- d) Măduva osoasă a fost expusă la substanța (substanțele) chimică(e) de testat.

Referințele bibliografice prezintă recomandări privind cele mai adecvate metode statistice (13). Dovezi ale expunerii măduvei osoase la o substanță chimică de testat pot include o diminuare a indicelui mitotic sau măsurarea concentrațiilor plasmatiche sau sangvine din substanța (substanțele) chimică(e) de testat. În cazul administrării intravenoase, nu sunt necesare dovezi de expunere. În mod alternativ, datele ADME, obținute în cadrul unui studiu independent utilizând aceeași cale și aceeași specie, pot fi utilizate pentru a demonstra expunerea măduvei osoase. Rezultatele negative indică faptul că, în condițiile de testare, substanța chimică de testat nu provoacă aberații cromozomiale structurale în măduva osoasă a speciei testate.

În cazul unui răspuns clar pozitiv sau clar negativ, nu există nicio cerință referitoare la verificare.

În cazul în care răspunsul nu este în mod clar negativ sau pozitiv și pentru contribui la stabilirea relevanței biologice a rezultatului (de exemplu, o creștere slabă sau de limită), datele se evaluează de către experți și/sau prin investigații suplimentare realizate pe experimentele existente. În unele cazuri, analizarea mai multor celule sau repetarea experimentului utilizând condiții de testare modificate ar putea fi utile.

În cazuri rare, chiar și după efectuarea de investigații suplimentare, datele vor exclude posibilitatea unui rezultat pozitiv sau negativ al substanței chimice de testat și, prin urmare, se va concluziona că studiul este echivoc.

Frecvența celulelor poliploide și enderoduplicate în metafază în cadrul numărului total de celule în metafază se înregistrează separat. O creștere a numărului de celule poliploide/enderoduplicate poate să indice faptul că substanța chimică de testat este capabilă să inhibe procesele mitotice sau avansarea ciclului celular (a se vedea punctul 3).

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Rezumat

Substanța chimică de testat:

- sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile;
- stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște.

Substanță monocomponentă:

- aspect fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;
- identificare chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS, Codul SMILES sau InChI, formula structurală, puritatea, identitatea impurităților chimice, după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

- caracterizată, în măsura în care este posibil, prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Prepararea substanței chimice de testat:

- justificarea alegerii vehiculului;
- solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent/vehicul, dacă se cunoaște;
- prepararea formulărilor hranei, apei potabile sau inhalărilor;
- determinări analitice cu privire la formulări (de exemplu, stabilitatea, omogenitatea, concentrațiile nominale), atunci când sunt realizate.

Animalele de experiență:

- specia/șușă utilizată și justificarea utilizării;
- numărul, vârsta și sexul animalelor;
- sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;
- metoda de identificare unică a animalelor;
- pentru studiile pe termen scurt: greutatea corporală a fiecărui animal la începutul și sfârșitul testului; pentru studiile cu durată mai mare de o săptămână: greutatea corporală a fiecărui animal pe durata studiului și consumul de hrană. Se include intervalul de greutate, greutatea medie și deviația standard pentru fiecare grup.

Condițiile de testare:

- martori pozitivi și negativi (vehicul/solvent);
- datele din studiul pentru stabilire a dozelor, dacă s-a realizat;
- justificarea alegerii nivelului dozei administrate;
- detaliile privind prepararea substanței chimice de testat;
- detalii privind modalitatea de administrare a substanței chimice de testat;
- justificarea căii și a duratei de administrare;
- metodele de verificare pentru a constata dacă substanța (substanțele) chimică(e) de testat a (au) ajuns în circulația generală sau în măduva osoasă;
- doza efectivă (mg/kg greutate corporală/zi), calculată din concentrația substanței chimice de testat (ppm) și în hrană/ apă potabilă și consum, dacă este cazul;
- detalii cu privire la calitatea hranei și a apei;
- metoda de eutanasiere;
- metoda de analgezie (atunci când se utilizează);
- descrierea amănunțită a schemelor de tratare și de prelevare a probelor și justificările alegerilor;
- metodele de preparare a lamelor;
- metodele de măsurare a toxicității;
- identitatea substanței chimice de inhibare a metafazei, concentrația acesteia, doza și timpul de administrare înainte de prelevare;
- proceduri pentru izolarea și conservarea probelor;
- criteriile pentru examinarea aberațiilor;

- numărul de celule în metafază analizate per animal și numărul de celule analizate pentru determinarea indicelui mitotic;
- criterii de acceptabilitate a studiului;
- criteriile utilizate pentru caracterizarea studiilor ca fiind pozitive, negative sau neconcludente.

Rezultate:

- starea animalelor înainte și pe toată durata testului, inclusiv semne de toxicitate;
- indicele mitotic, prezentat separat pentru fiecare animal;
- tipul și numărul aberațiilor și celulelor aberante, prezentat separat pentru fiecare animal;
- numărul total de aberații pentru fiecare grup împreună cu valoarea medie și deviațiile standard;
- numărul de celule cu aberații pentru fiecare grup împreună cu valoarea medie și deviațiile standard;
- variațiile ploidiei, dacă există, inclusiv frecvența celulelor poliploide și/sau enderoduplicate;
- relația doză-răspuns, dacă este posibil;
- analizele statistice și metodele aplicate;
- date care să demonstreze că a avut loc expunerea măduvei osoase;
- date cu privire la martorii negativi și pozitivi testați anterior în paralel, cu intervale, valori medii și deviații standard;
- date cu privire la martorii negativi și pozitivi testați anterior, cu intervale, valori medii și deviații standard și limite de control de 95 % pentru distribuție, precum și perioada de timp acoperită și numărul de observații;
- criteriile îndeplinite pentru un răspuns pozitiv sau negativ.

Discutarea rezultatelor.

Concluzie.

Referințe.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Adler, I.D. (1984), „Cytogenetic Tests in Mammals”, in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, p. 275-306.
- (3) Preston, R.J. *et al.* (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Vol. 189/2, p. 157-165.
- (4) Richold, M. *et al.* (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays”, în Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D. J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, p. 115-141.
- (5) Tice, R.R. *et al.* (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, p. 305-312.

- (6) Adler, I.D. *et al.* (1998), Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 417/1, p. 19-30.
 - (7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
 - (8) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, p. 87-90.
 - (9) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, p. 293-304.
 - (10) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, p. 313-319.
 - (11) OECD (2000), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N°19, OECD Publishing, Paris.
 - (12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, Vol. 1044, p. 147-163.
 - (13) Lovell, D.P. *et al.* (1989), „Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays”, în Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, p. 184-232.
-

Apendicele 1

DEFINIȚII

Aneuploidie: Orice deviere de la numărul diploid (sau haploid) normal de cromozomi, cu unul sau mai mulți cromozomi, dar nu prin multiplicarea unui (unor) set (seturi) întreg(i) de cromozomi (a se vedea poliploidie).

Centromer: Regiune (regiuni) dintr-un cromozom care, în timpul diviziunii celulare, este (sunt) legată(e) de fibrele fusului, ceea ce permite deplasarea ordonată a cromozomilor fiice către polii celulelor fiice.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Aberație de tip cromatidic: O leziune structurală a cromozomului, care se traduce prin ruperea cromatidelor singure sau prin ruperea și reuniunea între cromatide.

Aberație de tip cromozomial: O leziune structurală a cromozomului, care se traduce prin ruperea sau ruperea și reuniunea ambelor cromatide în același loc.

Endoreduplicare: Proces în care, după o perioadă S de replicare a ADN, nucleul nu intră în mitoză, ci începe o altă perioadă S. Rezultă cromozomi cu 4,8,16,... cromatide.

Lacună: Leziune acromatică mai mică decât lățimea unei cromatide și cu o eroare minimă de aliniere a cromatidelor.

Indice mitotic: Raportul dintre numărul de celule în mitoză și numărul total de celule într-o populație, care este o măsură a statusului de proliferare a respectivei populații celulare.

Aberație numerică: Modificare a numărului de cromozomi față de numărul normal caracteristic pentru animalele utilizate (aneuploidie).

Poliploidie: O aberație cromozomială numerică care implică o modificare a numărului întregului set de cromozomi, spre deosebire de o modificare numerică a unei părți a setului de cromozomi (a se vedea aneuploidia).

Aberație cromozomială structurală: O modificare a structurii cromozomilor, detectabilă la examinarea microscopică a celulelor în stadiul de metafază al diviziunii acestora, care se prezintă sub formă de deleții și fragmente, modificări intracromozomiale și intercromozomiale.

Substanță chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare.

Apendicele 2

MODELUL FACTORIAL DE IDENTIFICARE A DIFERENȚELOR ÎNTRE SEXE ÎN TESTUL IN VIVO DE ABERAȚIE CROMOZOMIALĂ**Modelul factorial și analiza acestuia**

În cadrul acestui model, se testează un minim de 5 masculi și 5 femele la fiecare nivel de concentrație, rezultând un model de testare care utilizează un minim de 40 de animale (20 de masculi și 20 de femele, plus martori pozitivi relevanți).

Acest model, care este unul dintre cele mai simple modele factoriale, este echivalent cu o analiză bidirecțională a varianței, având ca efecte principale sexul și nivelul de concentrație. Datele pot fi analizate utilizând numeroase pachete software standard pentru statistici cum ar fi SPSS, SAS, STATA, Genstat, precum și utilizând R.

Analiza împarte variabilitatea din setul de date în cea dintre sexe, dintre concentrații și cea referitoare la interacțiunea dintre sexe și concentrații. Se testează fiecare dintre termeni în raport cu o estimare a variabilității dintre animalele replică în cadrul grupurilor de animale de același sex la aceeași concentrație. Detalii complete privind metodologia de bază sunt disponibile în numeroase manuale statistice standard (a se vedea referințele) și în secțiunea „Ajutor” pusă la dispoziție odată cu pachetele statistice.

Analiza se desfășoară prin inspectarea condiției de interacțiune a concentrației sexului x în tabelul ANOVA ⁽¹⁾. În absența unei durate semnificative de interacțiune, valorile combinate între sexe sau valorile combinate între nivelurile de concentrație furnizează teste statistice valabile între niveluri pe baza duratei de variabilitate reunite în cadrul grupului.

Analiza continuă prin divizarea estimării variabilității dintre concentrații în contraste care furnizează un test de contraste lineare și pătratic ale răspunsurilor între nivelurile de concentrație. În cazul în care există o interacțiune semnificativă a concentrației sexului x, această condiție poate fi împărțită, de asemenea, în contraste de interacțiune liniară a sexului x și contraste de interacțiune pătratică a sexului x. Aceste condiții furnizează teste ale faptului dacă răspunsurile de concentrație sunt paralele pentru cele două sexe sau dacă există un răspuns diferențiat între cele două sexe.

Estimarea variabilității reunite în cadrul grupului poate fi utilizată pentru a furniza teste pe perechi cu privire la diferența dintre valorile medii. Aceste comparații ar putea fi efectuate între valorile medii pentru cele două sexe și între valorile medii pentru diferite niveluri de concentrație, cum ar fi cele pentru comparații cu nivelurile de martori negativi. În cazurile în care există o interacțiune semnificativă, se pot efectua comparații între valorile medii de concentrații diferite pentru un sex sau între valorile medii ale sexelor pentru aceeași concentrație.

Referințe

Există numeroase manuale statistice care tratează teoria, conceperea, metodologia, analiza și interpretarea modelelor factoriale, variind de la analizele cele mai simple cu doi factori la forme mai complexe utilizate în metodologia de concepere a experimentelor. Lista de mai jos este o listă neexhaustivă. Unele cărți oferă exemple concrete de modele comparabile, în unele cazuri codul pentru efectuarea analizelor utilizând diferite pachete software.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

⁽¹⁾ Statisticienii care adoptă o abordare bazată pe modelare precum utilizarea modelelor liniare generalizate (GLM) pot aborda analiza într-o manieră diferită, dar comparabilă, dar acest lucru nu va deriva în mod necesar din tabelul anova tradițional, care datează de la abordările algoritmice pentru calculul statisticilor, elaborate în epoca de dinaintea computerului.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.”

(5) În partea B, capitolul B.12 se înlocuiește cu următorul text:

„B. 12. Testul de micronucleu pe eritrocite de mamifere

INTRODUCERE

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea nr. 474 a OCDE (2016). Aceasta face parte dintr-o serie de metode de testare privind toxicologia genetică. A fost elaborat un document al OCDE care oferă informații succinte privind testarea pentru toxicologia genetică (1) și care trece în revistă modificările efectuate recent asupra orientărilor respective.

Testul *in vivo* de micronucleu pe eritrocite de mamifere este relevant în special pentru evaluarea genotoxicității deoarece, în pofida faptului că pot să varieze între specii, factorii de metabolism *in vivo*, farmacocinetica și procesele de regenerare a ADN sunt active și contribuie la răspunsuri. Un test *in vivo* este util, de asemenea, pentru investigarea suplimentară a genotoxicității detectate de un sistem *in vitro*.

Testul *in vivo* de micronucleu pe celule de mamifere se utilizează pentru detectarea leziunilor induse de substanța chimică de testat asupra cromozomilor sau asupra aparatului mitotic al eritroblaștilor. Testul evaluează formarea de micronuclee în eritrocitele prelevate fie din măduva osoasă, fie din celulele sângelui periferic ale animalelor, de regulă, rozătoare.

Scopul testului de micronucleu este identificarea substanțelor chimice care produc leziuni citogenetice care determină formarea de micronuclee conținând fragmente de cromozomi sau cromozomi întregi întârziați.

Atunci când un eritroblast din măduva osoasă evoluează într-un eritrocit imatur (denumit uneori și eritrocit policromatic sau reticulocit), nucleul principal este expulzat; orice nucleu care se formează poate să rămână în citoplasmă. Micronucleele se vizualizează sau se detectează mai ușor în aceste celule deoarece le lipsește nucleul principal. O creștere a frecvenței eritrocitelor imature micronucleate la animalele tratate indică producerea unei aberații cromozomiale de natură structurală sau numerică.

Eritrocite micronucleate nou-formate sunt identificate și numărate prin colorare, fiind evaluate apoi fie prin examinarea vizuală, utilizând un microscop, fie prin analiză automată. Numărarea de suficiente eritrocite imature din sângele periferic sau măduva osoasă a animalelor adulte este facilitată în mare măsură de utilizarea unei platforme automate de examinare. Astfel de platforme reprezintă alternative acceptabile ale evaluării manuale (2). Studiile comparative au arătat că astfel de metode, utilizând standarde de calibrare adecvate, pot oferi o sensibilitate și reproductibilitate intra- și inter-laboratoare mai bună decât examinarea microscopică manuală (3) (4). Sisteme automate care pot măsura frecvențele de eritrocite micronucleate includ, dar nu se limitează la, citometre de flux (5), platforme de analiză a imaginilor (6) (7) și citometre cu scanare laser (8).

Deși acest lucru nu este efectuat în mod normal ca parte a testului, fragmentele de cromozomi se pot distinge de cromozomii întregi printr-o serie de criterii. Unul dintre acestea este identificarea prezenței sau absenței unui kinetocor sau ADN centromeric, ambii fiind caracteristici cromozomilor întregi. Absența unui kinetocor sau ADN centromeric indică faptul că micronucleul conține doar fragmente de cromozomi, în timp ce prezența indică pierderea de cromozomi.

Definiții ale terminologiei utilizate sunt prevăzute în apendicele 1.

CONSIDERAȚII ÎNȚIALE

Măduva osoasă de la rozătoare adulte tinere este țesutul țintă pentru leziuni genetice în cadrul acestui test, având în vedere faptul că eritrocitele sunt produse în acest țesut. Măsurarea micronucleelor în eritrocitele imature în sângele periferic este acceptabilă la alte specii de mamifere a căror sensibilitate specifică pentru detectarea substanțelor chimice care produc aberații cromozomiale de natură structurală sau numerică a fost demonstrată (prin inducție de micronuclei în eritrocitele imature), pe baza unei justificări științifice. Frecvența eritrocitelor imature micronucleate reprezintă criteriul principal. Frecvența eritrocitelor mature care conțin micronuclei în sângele periferic poate fi utilizată, de asemenea, drept criteriu la speciile fără o selecție splenică puternică împotriva celulelor micronucleate și în cazul în care animalele sunt tratate în mod continuu pentru o perioadă care depășește durata de viață a eritrocitelor la speciile utilizate (de exemplu, 4 săptămâni sau mai mult la șoareci).

În cazul în care există dovezi că substanța (substanțele) chimică(e) de testat sau metabolitul (metaboliții) specific(i) nu va (vor) ajunge la țesutul țintă, utilizarea acestui test ar putea să nu fie potrivită.

Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera datele în scopul unui obiectiv de reglementare specific, trebuie să se examineze dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză, aceasta poate oferi rezultate adecvate în respectul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare în cazul în care există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Se expun animalele la substanța de testat printr-o cale de expunere corespunzătoare. În cazul în care se utilizează măduvă osoasă, animalele sunt eutanasiate în condiții umane la un moment adecvat după tratament, se extrage măduva osoasă, se prepară și se colorează lamele (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Atunci când se utilizează sânge periferic, acesta se colectează la un moment(e) adecvat(e) după tratament, se prepară și se colorează lamele (12) (16) (17) (18). Atunci când tratamentul este administrat acut, este important să se selecteze momente de recoltare a măduvei osoase sau a sângelui în care inducția eritrocitelor imature micronucleate provocată de tratament poate fi detectată. În cazul prelevării de probe din sângele periferic, o perioadă suficientă de timp trebuie, de asemenea, să treacă pentru ca aceste evenimente să apară în sângele în circulație. Lamele preparate se examinează pentru a depista prezența micronucleelor, fie prin vizualizare utilizând un microscop, prin analizarea imaginii, prin citometria în flux sau citometria cu scanare laser.

VERIFICAREA COMPETENȚEI LABORATORULUI

Verificările de competență

Pentru a stabili o experiență suficientă în efectuarea testului înainte de a-l utiliza pentru testele de rutină, laboratorul trebuie să fi demonstrat capacitatea de a reproduce rezultatele așteptate în urma datelor publicate (17) (19) (20) (21) (22) pentru frecvența micronucleelor cu minimum două substanțe chimice martor pozitive (inclusiv răspunsurile slabe cauzate de doze scăzute de martori pozitivi), cum ar fi cele enumerate în tabelul 1 și cu martori vehicul/solvent compatibili (a se vedea punctul 26). Aceste experimente utilizează doze care produc creșteri reproductibile și legate de doză și demonstrează sensibilitatea și gama dinamică a sistemului de testare în țesutul de interes (măduva osoasă sau sânge periferic), utilizând metoda de examinare care urmează să fie utilizată în cadrul laboratorului. Această cerință nu se aplică laboratoarelor care au experiență, și anume, care dețin o bază de date anterioare disponibilă astfel cum este definit la punctele 14-18.

Date privind martorii testați anterior

Pe parcursul verificărilor de competență, laboratorul trebuie să stabilească:

- o plajă de valori și o distribuție a martorilor pozitivi testați anterior și
- o plajă de valori și o distribuție a martorilor negativi testați anterior.

La obținerea primelor date pentru o distribuție a martorilor negativi testați anterior, martorii negativi testați în paralel trebuie să fie în concordanță cu datele publicate referitoare la martori, în cazul în care acestea există. Pe măsură ce tot mai multe date experimentale sunt adăugate la distribuția martorilor testați anterior, martorii negativi testați în paralel trebuie să fie, în mod ideal, de până la 95 % din limitele de control ale respectivei distribuții. Baza de date privind martorii negativi testați anterior trebuie să fie solidă din punct de vedere statistic pentru a asigura capacitatea laboratorului de a evalua distribuția datelor sale privind martorii negativi. Referințele bibliografice sugerează că poate fi necesar un minim de 10 de experimente, dar ar trebui, de preferință, ca baza de date să fie constituită din cel puțin 20 experimente efectuate în conformitate cu condiții experimentale comparabile. Laboratoarele trebuie să utilizeze metode de control al calității precum grafice de control [de exemplu, diagrame C sau X-bar (23)], pentru a identifica gradul de variabilitate al datelor lor și pentru a dovedi faptul că metodologia se află „sub control” în respectivul laborator. Referințele bibliografice prezintă recomandări suplimentare privind modalitatea în care se pot constitui și utiliza datele anterioare (și anume, criteriile de includere și de excludere a datelor în datele istorice și criteriile de acceptabilitate pentru un anumit experiment) (24).

În cazul în care laboratorul nu completează un număr suficient de experimente pentru a stabili o distribuție a martorilor negativi solidă din punct de vedere statistic (a se vedea punctul 15) în timpul verificărilor de competență (descrise la punctul 13), se acceptă posibilitatea elaborării distribuției în timpul primelor teste de rutină. Această abordare trebuie să respecte recomandările stabilite în referințele bibliografice (24) și rezultatele martorilor negativi obținute în aceste experimente trebuie să rămână în conformitate cu datele publicate cu privire la martorii negativi.

Orice modificare la protocolul experimental se ia în considerare în ceea ce privește impactul acesteia asupra datelor rezultate, care trebuie să fie în conformitate cu baza de date existentă privind martorii testați anterior a laboratorului. Doar inconsecvențele majore conduc la stabilirea unei noi baze de date privind martorii testați anterior, în cazul în care opiniile experților stabilesc faptul că acestea diferă față de distribuția anterioară (a se vedea punctul 15). În timpul procesului de restabilire, o bază completă de date cu privire la martorii negativi nu este neapărat necesară pentru a permite efectuarea unui test propriu-zis, cu condiția ca laboratorul să poată demonstra că valorile martor negative ale acestuia rămân consecvente fie cu bazele de date anterioare aferente, fie cu datele publicate corespunzătoare.

Datele cu privire la martorii negativi trebuie să cuprindă incidența eritrocitelor micronucleate imature pentru fiecare animal. Martorii negativi testați în paralel trebuie să fie, în mod ideal, de până la 95 % din limitele de control ale distribuției bazei de date privind martorii negativi testați în paralel a laboratorului. În cazul în care datele privind martorii negativi testați în paralel se situează în afara limitelor de control de 95 %, acestea pot fi acceptabile pentru a fi incluse în distribuția de martori testați anterior în măsura în care datele respective nu reprezintă valori aberante extreme și există dovezi că sistemul de testare se află „sub control” (a se vedea punctul 15) și nu există nicio dovadă de defecțiuni tehnice sau umane.

DESCRIEREA METODEI

Preparate

Selectarea speciilor de animale

Se utilizează șușe de laborator utilizate în mod curent, alegându-se animale adulte, tinere, sănătoase. Se pot utiliza șoareci, șobolani sau la o altă specie de mamifere adecvată. Atunci când se utilizează sânge periferic, trebuie stabilit faptul că îndepărtarea splenică a celulelor micronucleate din circulație nu compromite detectarea micronucleelor induse la speciile selectate. Acest lucru a fost demonstrat în mod clar în cazul sângelui periferic de șoarece și șobolan (2). Justificarea științifică pentru utilizării altor specii decât șobolani și șoareci trebuie furnizată în raport. În cazul în care se utilizează alte specii decât rozătoare, se recomandă ca măsurarea micronucleelor induse să se integreze în alt test de toxicitate corespunzător.

Condiții de adăpostire și de hrănire a animalelor

În cazul rozătoarelor, temperatura sălii în care se află animalele trebuie să fie de 22 °C ($\pm$ 3 °C). Cu toate că umiditatea relativă este, în mod ideal, de 50-60 %, aceasta trebuie să fie de cel puțin 40 % și să nu depășească, de preferință, 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Spațiul se iluminează artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Alegerea regimului alimentar poate fi influențată de necesitatea de a asigura o proporție adecvată a unei substanțe chimice de testat în cazul administrării prin această metodă. Rozătoarele se adăpostesc în grupuri mici (cel mult cinci pentru fiecare cușcă), de același sex și grup supus tratamentului, în cazul în care nu se preconizează niciun comportament agresiv, de preferință în cuști cu pardoseală solidă cu îmbogățire adecvată a mediului de viață. Animalele pot fi adăpostite individual în cazul în care acest lucru este justificat din punct de vedere științific.

Pregătirea animalelor

Se utilizează în mod normal animale adulte, tinere, sănătoase (pentru rozătoare, de preferință, de 6-10 săptămâni la începutul tratamentului, cu toate că animale puțin mai în vârstă sunt, de asemenea, acceptabile), care sunt distribuite în mod aleatoriu în grupe martor și grupe de tratament. Animalele se identifică în mod individual prin utilizarea unei metode umane, foarte puțin invazive (de exemplu, prin aplicarea de inele, crotaliere, microcipare sau identificare biometrică, dar nu prin secționarea urechii sau a degetului) și se aclimatizează la condițiile de laborator timp de minimum cinci zile. Cuștile trebuie dispuse astfel încât posibilele efecte datorate amplasării în cușcă să fie reduse la minim. Se evită contaminarea încrucișată dintre martorul pozitiv și substanța chimică de testat. La începutul studiului, greutatea animalelor trebuie să prezinte o variație minimă și să nu depășească $\pm$ 20 % din greutatea medie a fiecărui sex.

Pregătirea dozelor

Substanțele de testat în stare solidă se dizolvă sau se pun în suspensii în solvenți sau vehicule corespunzătoare sau se amestecă în alimente sau în apa de băut înainte de a fi administrate animalelor. Substanțele chimice de testat în stare lichidă se pot administra direct sau se pot dilua înainte de administrare. Pentru expunerile prin inhalare, substanțele chimice de testat pot fi administrate sub formă de gaz, vapori sau aerosol solid/lichid, în funcție de proprietățile fizico-chimice ale acestora. Se utilizează preparate proaspete de substanță chimică de testat, cu excepția cazului în care datele de stabilitate demonstrează caracterul acceptabil al stocării și definesc condiții de stocare corespunzătoare.

Condiții de testare*Solvent/vehicul*

Solventul/vehiculul nu trebuie să producă efecte toxice la volumele de doză utilizate și nu trebuie să reacționeze chimic cu substanțele chimice de testat. În cazul în care se utilizează alți solvenți/vehicule decât cei recunoscuți, includerea acestora trebuie să fie justificată cu date de referință care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare mai întâi utilizarea unui solvent/vehicul apos. Exemple de solvenți/vehicule compatibili utilizați în mod obișnuit includ apa, soluția fiziologică salină, soluția de metilceluloză, soluția de carboximetilceluloză sare de sodiu, uleiul de măsline și uleiul de porumb. În absența unor date anterioare sau publicate cu privire la martori, care să ateste că niciun micronucleu sau efect vătămător nu este indus de către un anumit solvent/vehicul atipic, se efectuează un studiu inițial pentru a stabili acceptabilitatea martorului tratat cu solvent/vehicul.

Controale

Martorii pozitivi

Pentru fiecare test se include, în mod normal, un grup de animale tratate cu o substanță chimică martor pozitivă. Acest lucru poate fi eliminat în cazul în care laboratorul de testare a demonstrat competență în efectuarea testului și a stabilit un interval de martori pozitivi testați anterior. În cazul în care un grup de martori pozitivi testați în paralel nu este inclus, în fiecare experiment se includ martori examinați (lame fixate și necolorate sau probe de suspensie celulară, în funcție de metoda de examinare). Acestea pot fi obținute prin includerea în sistemul de examinare a studiului de probe de referință adecvate care au fost obținute și păstrate în urma unui experiment separat cu martori pozitivi efectuat periodic (de exemplu, la fiecare 6-18 luni), de exemplu, în timpul testărilor de competență și ulterior în mod regulat, dacă este necesar.

Substanțele chimice martor pozitive trebuie să producă în mod fiabil o creștere detectabilă în ceea ce privește frecvența micronucleelor față de nivelul spontan. Atunci când se utilizează examinarea manuală prin microscopie, dozele de martor pozitiv se aleg astfel încât să se obțină efecte clare, dar fără a releva imediat examinătorului identitatea probelor codate. Pentru martorul pozitiv, se poate accepta administrarea pe o cale diferită față de cea utilizată în cazul substanței chimice de testat, folosind o schemă de tratament diferită și o singură prelevare de probe. În plus, utilizarea de martori pozitivi din aceeași clasă de substanțe chimice poate fi luată în considerare, după caz. Tabelul 1 include exemple de substanțe chimice martor pozitive.

Tabelul 1

Exemple de substanțe chimice martor pozitive.

Substanțe chimice și Nr. CAS
Metansulfonat de etil [NR. CAS 62-50-0]
Metansulfonat de metil [NR. CAS 66-27-3]
Etil nitrozouree [NR. CAS 759-73-9]
Mitomycină C [NR. CAS 50-07-7]
Ciclofosfamidă (monohidrat) [NR. CAS 50-18-0 (NR. CAS 6055-19-2)]
Trietilenmelamină [NR. CAS 51-18-3]
Colchicină [NR. CAS 64-86-8] sau vinblastină [NR. CAS 865-21-4] – ca aneugeni

Martorii negativi

Animalele din grupul martor negativ se iau în considerare la fiecare prelevare de probe și se manipulează de altfel în același mod precum grupurile tratate, cu excepția faptului că nu beneficiază de tratamentul cu substanța chimică de testat. În cazul în care un solvent/vehicul este utilizat pentru administrarea substanței chimice de testat, acesta se administrează grupului martor. Cu toate acestea, în cazul în care coerența variabilității inter-animale și frecvențele celulelor cu micronucleu sunt demonstrate de datele privind martorii negativi testați anterior la fiecare prelevare de probe efectuată de către laboratorul de testare, ar putea fi necesară o singură prelevare de probe pentru martorul negativ. În cazul în care se utilizează o singură prelevare de probe pentru martorii negativi, aceasta trebuie să fie prima prelevare de probe utilizată în cadrul studiului.

În cazul în care se utilizează sânge periferic, se acceptă o probă prelevată înainte de tratament în locul unui martor negativ testat în paralel pentru studiile pe termen scurt, atunci când datele rezultate sunt coerente cu baza de date privind martorii testați anterior a laboratorului de testare. În cazul șobolanilor, s-a demonstrat că prelevarea de probe de volume mici (de exemplu, sub 100 μ l/zi) înainte de tratament are un impact minim asupra frecvenței de fond a micronucleelor (25).

PROCEDURĂ

Numărul și sexul animalelor

În general, reacția de micronucleu este similară între masculi și femele, prin urmare, majoritatea studiilor ar putea fi efectuate pe oricare dintre sexe (26). Datele care demonstrează diferențe relevante între masculi și femele (de exemplu, diferențele în materie de toxicitate sistemică, metabolism, biodisponibilitate, toxicitate în măduva osoasă, etc., inclusiv, de exemplu, într-un studiu de stabilire a dozelor) ar încuraja utilizarea ambelor sexe. În acest caz, ar fi adecvat să se efectueze un studiu în cazul ambelor sexe, de exemplu, ca parte a unui studiu de toxicitate cu doză repetată. Utilizarea modelului factorial poate fi adecvată în cazul în care sunt utilizate ambele sexe. Apendicele 2 prezintă detalii cu privire la modalitatea de analiză a datelor care utilizează acest model.

Dimensiunea grupurilor la începutul studiului se stabilește cu scopul de a furniza pentru fiecare grup cel puțin 5 animale analizabile de același sex sau din fiecare sex în cazul în care ambele sexe sunt utilizate. În cazul în care expunerea umană la substanțe chimice este specifică unui anumit sex, cum ar fi, de exemplu, în cazul unor produse farmaceutice, testul se efectuează pe sexul corespunzător. Ca o orientare pentru cerințe maxime tipice animalelor, un studiu pe măduva osoasă efectuat în conformitate cu parametrii stabiliți la punctul 37, cu trei grupuri de dozare și martori negativi și pozitivi testați în paralel (fiecare grup alcătuit din cinci animale de același sex) ar necesita între 25 și 35 de animale.

Doze

În cazul în care se efectuează un studiu preliminar de stabilire a dozelor deoarece nu există date adecvate disponibile pentru a contribui la selectarea dozei, acesta se realizează în același laborator, utilizând aceeași specie, sușă, sex și regim de tratament precum cele care urmează să fie utilizate în studiul principal (27). Studiul are ca obiectiv identificarea dozei maxime tolerate (DMT), definită drept doza cea mai ridicată care va fi tolerată fără dovezi de toxicitate care să limiteze studiul, în funcție de durata perioadei de studiu [de exemplu, cu reducerea greutatei corporale sau a citotoxicității sistemului hematopoietic, dar nu deces sau semne de durere, suferință sau stres care să necesite eutanasiere în condiții umane (28)].

Doza maximă poate fi definită, de asemenea, ca doza care produce toxicitate în măduva osoasă (de exemplu, o reducere a proporției de eritrocite imature în raport cu numărul total de eritrocite din măduva osoasă sau din sângele periferic de mai mult de 50 %, dar nu mai puțin de 20 % din valoarea probei martor). Cu toate acestea, atunci când sunt analizate celulele CD71 pozitiv în circulația periferică a sângelui (și anume, prin citometria de flux), această fracție foarte tânără de eritrocite imature răspunde mai repede provocărilor toxice decât cohorta mai mare de eritrocite imature cu ARN pozitiv. Prin urmare, toxicitatea aparent mai mare ar putea fi evidentă prin modelele de expunere acută care examinează fracția CD71 pozitivă de eritrocite imature în raport cu cele care identifică eritrocite imature pe baza conținutului de ARN. Din acest motiv, atunci când se utilizează experimente de cinci sau mai puține zile de tratament, doza cea mai ridicată pentru substanțele chimice de testat care provoacă toxicitate poate fi definită ca doza care provoacă o reducere semnificativă din punct de vedere statistic a proporției de eritrocite imature CD71 pozitiv în raport cu numărul total de eritrocite, dar nu la mai puțin de 5 % din valoarea probei martor (29).

Substanțele chimice care prezintă saturație a proprietăților toxicocinetice sau provoacă procese de detoxifiere care pot conduce la o diminuare a expunerii după un tratament pe termen lung pot reprezenta excepții de la criteriile de stabilire a dozelor și se evaluează de la caz la caz.

Pentru a obține informații privind relația doză-răspuns, un studiu complet trebuie să includă un grup martor negativ și un minim de trei niveluri de doze separate, în general, de un factor de 2, dar nu mai mult de 4. În cazul în care substanța chimică de testat nu produce toxicitate într-un studiu de stabilire a dozelor sau pe baza datelor existente, doza maximă pentru o perioadă de administrare de 14 zile sau mai mult este de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi sau pentru perioade de administrare mai mici de 14 zile, 2 000 mg/kg greutate corporală/zi. Cu toate acestea, în cazul în care substanța chimică de testat provoacă toxicitate, DMT trebuie să fie cea mai mare doză administrată, iar dozele utilizate trebuie, de preferat, să acopere un interval de toxicitate de la doza maximă până la o doză care provoacă toxicitate minimă sau nu provoacă toxicitate. În cazul în care se observă toxicitate în țesutul țintă (măduva osoasă) la toate dozele testate, se recomandă efectuarea unui studiu suplimentar la doze netoxice. Studiile care au ca scop caracterizarea pe deplin a informațiilor cantitative doză-răspuns pot necesita grupuri suplimentare de doze. Pentru anumite tipuri de substanțe chimice de testat (de exemplu, produsele farmaceutice umane) reglementate prin cerințe specifice, aceste limite pot varia.

Test-limită

În cazul în care experimentele pentru stabilirea intervalului sau datele existente legate de șușele de animale indică faptul că un regim de tratament de cel puțin o doză limită (descrisă mai jos) nu produce efecte toxice detectabile (inclusiv nicio diminuare a proliferării măduvei osoase sau alte semne de citotoxicitate în țesutul țintă) și în cazul în care o genotoxicitate este improbabilă pe baza studiilor *in vitro* de genotoxicitate sau datelor provenite de la substanțele chimice cu o structură apropiată, este posibil ca un studiu integral cu trei niveluri de doze diferite să nu fie considerat necesar dacă s-a demonstrat că substanța (substanțele) chimică(e) de testat ajunge (ajung) la țesutul țintă (măduva osoasă). În astfel de cazuri, un singur nivel de doză, la doza limită, poate fi suficient. În cazul în care administrarea se realizează timp de 14 zile sau mai mult, doza limită este de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi. Pentru administrarea cu o durată mai mică de 14 zile, doza limită este de 2 000 mg/kg greutate corporală/zi.

Administrarea dozelor

La elaborarea unui test se ia în considerare calea anticipată de expunere umană. Prin urmare, căile de expunere precum alimentația, apa potabilă, expunerea locală, subcutanată, intravenoasă, calea orală (prin gavaj), inhalarea, expunerea intratraheală sau implantarea pot fi alese, după caz. În orice caz, calea se alege pentru a asigura expunerea adecvată a țesutului (țesuturilor) țintă. Injecția intraperitoneală nu se recomandă, în general, deoarece nu este o cale destinată expunerii umane și se utilizează doar cu justificări științifice specifice. În cazul în care substanța chimică de testat este administrată în amestec cu hrana sau apa potabilă, în special în cazul administrării unice, se acordă atenție deosebită intervalului dintre consumul de hrană și apă și prelevarea de probe, care trebuie să fie suficient pentru a permite identificarea efectelor (a se vedea punctul 37). Volumul maxim de lichid care se poate administra prin gavaj sau prin injecție într-o singură repriză depinde de dimensiunea animalului de laborator. Volumul nu trebuie să depășească, în mod normal, 1 ml/100 g greutate corporală, exceptând cazul soluțiilor apoase, când se poate administra un maxim de 2 ml/100 g. Utilizarea unor volume mai mari decât cele menționate trebuie să fie justificată. Exceptând substanțele chimice de testat iritante sau corozive, care vor prezenta, în mod normal, efecte exacerbate la concentrații mai mari, variația volumului testat se reduce la minim prin ajustarea concentrației, astfel încât să se asigure administrarea unui volum constant în raport cu greutatea corporală pentru toate dozele.

Schema de tratament

De preferință, se efectuează 2 sau mai multe tratamente, administrate la intervale de 24 de ore, în special la integrarea acestui test în alte studii de toxicitate. Cu titlu subsidiar, pot fi administrate tratamente unice, dacă se justifică științific (de exemplu, substanțe chimice de testat despre care se știe că blochează ciclul celular). Substanțele chimice de testat se pot administra, de asemenea, în doză fracționată, și anume, două sau mai multe tratamente în aceeași zi, la distanță de nu mai mult de 2-3 ore, pentru a facilita administrarea unui volum mare. În aceste circumstanțe sau atunci când substanța chimică de testat este administrată prin inhalare, momentul pentru prelevarea de probe trebuie programat în funcție de ultima administrare a dozei sau de sfârșitul expunerii.

Testul poate fi efectuat la șoareci sau șobolani prin una dintre următoarele trei metode:

- a. Animalele se tratează cu substanța chimică de testat o singură dată. Probele de măduvă osoasă se prelevează de cel puțin două ori (de la grupuri independente de animale), nu mai devreme de 24 de ore după tratament, fără să se prelungească mai mult de 48 de ore după tratament, cu interval (intervale) corespunzător (corespunzătoare) între probe, cu excepția cazului în care o substanță chimică de testat este cunoscută ca având un timp de înjumătățire excepțional de lung. Prelevarea de probe mai devreme de 24 de ore după tratament trebuie justificată. Probele de sânge periferic se prelevează cel puțin de două ori (de la același grup de animale), începând nu mai devreme de 36 de ore după tratament, la un interval corespunzător (la intervale corespunzătoare) după prima probă, fără să se depășească 72 de ore. După prima prelevare de probe, se tratează toate grupurile de dozare și se colectează probele pentru analiză; cu toate acestea, la ultima (ultimele) prelevare (prelevări) de probe se administrează doar dozele maxime. În cazul în care se constată o reacție pozitivă la un moment de prelevare, prelevarea suplimentară de probe nu este necesară, cu excepția cazului în care sunt necesare informații cantitative doză-răspuns. Timpii de recoltă descriși mai sus sunt o consecință a cineticii apariției și dispariției micronucleelor în cele 2 straturi de țesuturi.
- b. În cazul în care sunt utilizate două tratamente zilnice (de exemplu, două tratamente la intervale de 24 de ore), probele se prelevează o singură dată între 18 și 24 de ore după tratamentul final pentru măduva osoasă sau o singură dată între 36 și 48 de ore după tratamentul final pentru sângele periferic (30). Timpii de recoltă descriși mai sus sunt o consecință a cineticii apariției și dispariției micronucleelor în cele 2 straturi de țesuturi.
- c. În cazul în care se utilizează trei sau mai multe tratamente zilnice (de exemplu, trei sau mai multe tratamente la intervale de aproximativ 24 de ore), probele de măduvă osoasă se prelevează nu mai târziu de cel mult 24 de ore de la ultimul tratament, iar sângele periferic se prelevează nu mai târziu de 40 de ore de la ultimul tratament (31). Această opțiune de tratament permite combinația dintre testul Comet (de exemplu, prelevarea de probe 2-6 de ore de la ultimul tratament) și testul de micronucleu și integrarea testului de micronucleu în studiile de toxicitate cu doză repetată. Datele acumulate sugerează faptul că inducția de micronuclee poate fi observată în aceste intervale de timp mai mari atunci când au fost efectuate 3 sau mai multe administrări (15).

Alte regime de dozare sau de prelevare pot fi utilizate atunci când este relevant și se justifică din punct de vedere științific, precum și pentru a facilita integrarea cu alte teste de toxicitate.

Observații

Se recomandă efectuarea de observații clinice generale asupra animalelor de experiență și înregistrarea semnelor clinice cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași (aceleași) oră (ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrarea dozei. În perioada de administrare a dozei, se examinează toate animalele cel puțin de două ori pe zi pentru a se determina morbiditatea sau mortalitatea. Se cântăresc toate animalele la începutul studiului, cel puțin o dată pe săptămână în timpul studiilor cu doze repetate și la eutanasiere. În cadrul studiilor cu o durată de cel puțin o săptămână, se măsoară consumul de hrană cel puțin săptămânal. În cazul în care substanța chimică de testat este administrată prin apa de băut, se măsoară consumul de apă la fiecare schimbare de apă și cel puțin o dată pe săptămână. Animalele care prezintă indicatori neletali de toxicitate excesivă se eutanasează înaintea de încheierea perioadei de testare (28). În anumite circumstanțe, temperatura corpului animalelor ar putea fi monitorizată, având în vedere faptul că hipertermia și hipotermia provocată de tratament au fost implicate în producerea de rezultate false (32) (33) (34).

Expunere țesutului țintă

Se prelevează o probă de sânge la momentul (momentele) adecvat(e) pentru a permite investigarea nivelurilor plasmatiche ale substanțelor chimice de testat cu scopul de a demonstra faptul că măduva osoasă a fost expusă, acolo unde este cazul și unde nu există alte date de expunere (a se vedea punctul 48).

Prepararea măduvei osoase/a sângelui

Celule de măduvă osoasă se obțin în mod obișnuit din femurul sau tibia animalelor imediat după eutanasierea în condiții umane. De regulă, celulele se extrag, se depun pe lame și se colorează prin metodele stabilite. Cantități mici de sânge periferic pot fi obținute în conformitate cu standardele de bunăstare animală adecvate, folosind fie o metodă care să permită supraviețuirea animalelor de experiență precum sângerarea din vena caudală sau alte vase de sânge corespunzătoare, fie prin puncție cardiacă sau prelevarea de probe de la un vas mare la eutanasierea animalului. Atât pentru eritrocitele derivate din măduva osoasă, cât și pentru cele derivate din sânge periferic, în funcție de metoda de analiză, celulele pot fi colorate imediat supravital (16) (17) (18), pot fi întinse pe lame și apoi colorate pentru microscopie sau pot fi fixate și colorate în mod adecvat pentru citometria de flux. Utilizarea unui colorant specific pentru ADN [de exemplu, oranj de acridină (35) sau Hoechst 33258 plus pironină-Y (36)] poate să elimine unele dintre artefactele asociate utilizării unui colorant nespecific pentru ADN. Avantajul menționat nu exclude utilizarea coloranților convenționali (de exemplu, Giemsa pentru analiza microscopică). Se pot utiliza și alte sisteme [de exemplu, coloane de celuloză pentru eliminarea celulelor nucleate (37) (38)], cu condiția ca sistemele respective să se fi dovedit compatibile cu pregătirea probelor în laborator.

În cazul în care aceste metode sunt aplicabile (39), anticorpii antikinetocori, metoda FISH cu sonde ADN pancen-tromerice (40) sau marcarea *in situ* cu ajutorul amorselor pancentromerice, împreună cu un colorant de contrast al ADN adecvat (41) pot fi utilizați pentru a identifica natura micronucleelor (cromozomi/fragmente cromozomiale) pentru a stabili dacă mecanismul inducției de micronuclee se datorează activității clastogene și/sau aneugene. Alte metode de diferențiere a efectelor clastogene și aneugene pot fi utilizate, cu condiția ca eficacitatea acestora să fi fost demonstrată.

Analiză (manuală și automată)

Toate lamele sau probele pentru analiză, inclusiv cele cu martori pozitivi și negativi, se codifică în mod independent înainte de orice tip de analiză și se randomizează astfel încât examinatorul să nu cunoască condiția de tratament; o astfel de codificare nu este necesară atunci când se utilizează sisteme automate de examinare care nu se bazează pe inspecție vizuală și nu pot fi afectate de subiectivitatea operatorului. Pentru fiecare animal se determină proporția de eritrocite imature în raport cu numărul total de eritrocite (imature + mature) prin examinarea a cel puțin 500 de eritrocite pentru măduva osoasă și 2 000 de eritrocite pentru sângele periferic (42). Cel puțin 4 000 de eritrocite imature se analizează per animal pentru a determina incidența eritrocitelor imature micronucleate (43). În cazul în care datele cu privire la martorii negativi testați anterior indică faptul că valoarea medie a frecvenței de fond de eritrocite imature micronucleate este < 0,1 % în laboratorul de testare, se ia în considerare examinarea de celule suplimentare. Atunci când se analizează probe, proporția de eritrocite imature în raport cu numărul total de eritrocite de la animalele tratate nu trebuie să fie mai mică de 20 % din proporția matorului tratat cu vehicul/solvent la examinarea prin microscopie și mai mică decât aproximativ 5 % din proporția matorului tratat cu vehicul/solvent la examinarea de eritrocite imature CD71+ prin metode citometrice (a se vedea punctul 31) (29). De exemplu, pentru un test de măduvă osoasă examinat prin microscopie, în cazul în care proporția de probă martor de eritrocite imature în măduva osoasă este de 50 %, limita superioară de toxicitate ar fi de 10 % eritrocite imature.

Deoarece splina de șobolan sechestrează și distruge eritrocitele micronucleate, pentru a menține un nivel ridicat de sensibilitate a testului atunci când se analizează sânge periferic de șobolan, este preferabil să se limiteze analiza eritrocitelor imature micronucleate la cea mai tânără fracție. Atunci când se utilizează metode de analiză automată, aceste eritrocite imature pot fi identificate pe baza conținutului lor ridicat de ARN sau pe baza nivelului ridicat de receptori de transferină (CD71+) exprimat pe suprafața acestora (31). Cu toate acestea, comparația directă a diferitelor metode de colorare a arătat că se pot obține rezultate satisfăcătoare prin diferite metode, inclusiv colorarea convențională cu oranj de acridină (3) (4).

DATE ȘI RAPORTARE

Prelucrarea rezultatelor

Se recomandă prezentarea sub formă de tabel a datelor pentru fiecare animal. Pentru fiecare animal, se consemnează în mod separat numărul de eritrocite imature examinate, numărul de eritrocite imature micronucleate și numărul de eritrocite imature în raport cu numărul total de eritrocite. Atunci când șoarecii se tratează în mod continuu timp de 4 săptămâni sau mai mult, se prezintă, de asemenea, datele privind numărul și proporția de eritrocite mature micronucleate, dacă au fost colectate. Datele cu privire la toxicitatea animală și semnele clinice trebuie, de asemenea, să fie raportate.

Criterii de acceptabilitate

Următoarele criterii determină acceptabilitatea testului:

- a. Datele privind martorii negativi testați în paralel sunt considerate acceptabile pentru adăugarea la baza de date cu privire la martorii testați anterior (a se vedea punctele 1518).
- b. Martorii pozitivi testați în paralel sau martorii examinați trebuie să inducă răspunsuri compatibile cu cele provenite din baza de date cu privire la martorii pozitivi testați anterior și să producă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ (a se vedea punctele 24-25).
- c. Un numărul corespunzător de doze și celule a fost analizat.
- d. Criteriile de selectare a dozei maxime sunt consecvente cu cele descrise la punctele 30-33.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

Cu condiția îndeplinirii tuturor criteriilor de acceptabilitate, o substanță chimică de testat este considerată în mod clar pozitivă în cazul în care:

- a. Cel puțin unul dintre grupurile tratate prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic a frecvenței de eritrocite imature micronucleate, comparativ cu martorul negativ testat în paralel,
- b. Această creștere este raportată la doză cel puțin la un moment de prelevare de probe atunci când este evaluată prin intermediul unui test adecvat de stabilire a tendinței și
- c. Oricare dintre aceste rezultate se situează în afara distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limite de control de 95 % pe baza distribuției Poisson).

În cazul în care se analizează doar doza maximă la un anumit moment de prelevare de probe, o substanță chimică de testat este considerată în mod clar pozitivă în cazul în care există o creștere semnificativă din punct de vedere statistic, comparativ cu martorul negativ testat în paralel, iar rezultatele se situează în afara distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limite de control 95 % pe baza distribuției Poisson). Referințele bibliografice prezintă recomandări pentru cele mai adecvate metode statistice (44) (45) (46) (47). La efectuarea unei analize a relației doză-răspuns, se analizează cel puțin trei grupuri tratate de doze. Testele statistice utilizează animalul ca unitate experimentală. Rezultatele pozitive ale testului de micronucleu indică faptul că substanța chimică de testat determină formarea de micronuclee ca urmare a leziunilor cromozomiale sau leziunilor aparatului mitotic din eritroblaștii speciei testate. În cazul în care s-a efectuat un test pentru depistarea centromerelor în micronuclee, o substanță chimică de testat ce produce micronuclee care conțin centromer (ADN centromeric sau kinetocor, indicând pierdere de cromozomi întregi) reprezintă dovada că substanța chimică de testat este un aneugen.

Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată în mod clar negativ dacă, în toate condițiile experimentale examinate:

- a. Niciunul dintre grupurile tratate nu prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic a frecvenței eritrocitelor imature micronucleate în comparație cu martorul negativ testat în paralel,

- b. Nu există nicio creștere raportată la doză indiferent de momentul prelevării, atunci când este evaluată prin intermediul unui test adecvat de stabilire a tendinței,
- c. Toate rezultatele se situează în interiorul distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limite de control de 95 % pe baza distribuției Poisson) și
- d. Măduva osoasă a fost expusă la substanța (substanțele) chimică(e) de testat.

Referințele bibliografice prezintă recomandări pentru cele mai adecvate metode statistice (44) (45) (46) (47). Dovezi ale expunerii măduvei osoase la o substanță chimică de testat pot include o diminuare a raportului dintre eritrocitele imature față de eritrocitele mature sau măsurarea concentrațiilor plasmatiche sau sangvine din substanța chimică de testat. În cazul administrării intravenoase, nu sunt necesare dovezi de expunere. În mod alternativ, datele ADME, obținute în cadrul unui studiu independent utilizând aceeași cale și aceeași specie, pot fi utilizate pentru a demonstra expunerea măduvei osoase. Rezultatele negative indică faptul că, în condițiile de testare, substanța chimică de testat nu produce micronuclee în eritrocitele imature ale speciei de testat.

În cazul unui răspuns clar pozitiv sau clar negativ, nu există nicio cerință referitoare la verificare.

În cazul în care răspunsul nu este în mod clar negativ sau pozitiv și pentru a acorda asistență în stabilirea relevanței biologice a rezultatului (de exemplu, o creștere slabă sau de limită), datele se evaluează de către experți și/sau prin investigații suplimentare realizate pe experimentele existente. În unele cazuri, analizarea mai multor celule sau repetarea experimentului utilizând condițiile experimentale modificate ar putea fi utile.

În cazuri rare, inclusiv după efectuarea de investigații suplimentare, datele vor exclude posibilitatea unui rezultat pozitiv sau negativ al substanței chimice de testat și, prin urmare, studiul va fi concluzionat ca fiind echivoc.

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Rezumat

Substanța chimică de testat:

- sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile;
- stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște.

Substanță monocomponentă:

- aspect fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;
- identificare chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS, Codul SMILES sau InChI, formula structurală, puritatea, identitatea impurităților chimice, după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

- caracterizată în măsura în care este posibil prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Prepararea substanței chimice de testat:

- justificarea alegerii vehiculului;
- solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent/vehicul, dacă se cunoaște;

- prepararea formulărilor hranei, a apei potabile sau a inhalărilor;
- determinări analitice cu privire la formulări (de exemplu, stabilitatea, omogenitatea, concentrațiile nominale), atunci când sunt realizate.

Animalele de experiență:

- specia/șușă utilizată și justificarea utilizării;
- numărul, vârsta și sexul animalelor;
- sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;
- metodă de identificare unică a animalelor;
- pentru studiile pe termen scurt: greutatea corporală a fiecărui animal la începutul și la sfârșitul testului; pentru studiile mai lungi de o săptămână: greutatea corporală a fiecărui animal pe durata studiului și consumul de hrană. Se includ intervalul de greutate, valoarea medie și deviația standard pentru fiecare grup.

Condițiile de testare:

- date cu privire la martori pozitivi și negativi (solvent/vehicul);
- datele din studiul de stabilire a dozelor, dacă s-a realizat;
- justificarea alegerii nivelului dozei administrate;
- detaliile privind prepararea substanței chimice de testat;
- detalii privind modalitatea de administrare a substanței chimice de testat;
- justificarea căii și a duratei de administrare;
- metodele de verificare pentru a constata dacă substanța (substanțele) chimică(e) de testat a (au) ajuns în circulația generală sau în țesutul țintă;
- doza efectivă (mg/kg greutate corporală/zi) calculată din concentrația substanței chimice de testat (ppm) și în hrană/ apă potabilă și consum, dacă este cazul;
- detalii cu privire la calitatea hranei și a apei;
- metoda de eutanasiere;
- metoda de analgezie (atunci când se utilizează);
- descrierea amănunțită a schemelor de tratare și de prelevare a probelor și justificările alegerilor;
- metodele de preparare a lamelor;
- proceduri pentru izolarea și conservarea probelor;
- metodele de măsurare a toxicității;
- criteriile pentru examinarea eritrocitelor imature micronucleate;
- numărul de celule analizate per animal pentru a determina frecvența eritrocitelor imature micronucleate și pentru a determina proporția de eritrocite imature în raport cu eritrocitele mature;
- criterii de acceptabilitate a studiului;
- metode precum utilizarea de anticorpi antikinetocori sau probe ADN cu centromere specifice pentru a determina dacă micronucleele conțin cromozomi întregi sau fragmentați, dacă se aplică.

Rezultate:

- starea animalelor înainte și pe toată durata testului, inclusiv semne de toxicitate;
- proporția de eritrocite imature în raport cu numărul total de eritrocite;
- numărul de eritrocite imature micronucleate, prezentat separat pentru fiecare animal;
- valoarea medie $\pm$ deviația standard pentru eritrocitele imature micronucleate pentru fiecare grup;
- relația doză-răspuns, dacă este posibil;
- analizele statistice și metodele aplicate;
- date privind martorii pozitivi și negativi testați în paralel, cu intervale, valori medii și deviații standard;
- date cu privire la martorii negativi și pozitivi testați anterior cu intervale, valori medii și deviații standard și limite de control de 95 % pentru distribuție, precum și perioada de timp acoperită și numărul de puncte de date;
- date care să demonstreze că măduva osoasă a fost expusă;
- date de caracterizare indicând dacă micronucleele conțin cromozomi întregi sau fragmentați, dacă se aplică;
- criterii îndeplinite pentru un răspuns pozitiv sau negativ.

*Discutarea rezultatelor.**Concluzie.**Referințe.*

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) OECD(2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Hayashi, M. *et al.* (2007), *in vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, p. 10-30.
- (3) MacGregor, J.T. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, *Toxicology Sciences*, Vol. 94/1, p. 92-107.
- (4) Dertinger, S.D. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, *Toxicological Sciences*, Vol. 94/1, p. 83-91.
- (5) Dertinger, S.D. *et al.* (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, *Mutagenesis*, Vol. 26/1, p. 139-145.
- (6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, *Mutation Research*, Vol. 370/1, p. 65-73.
- (7) Asano, N. *et al.* (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitaly stained peripheral blood cells, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 404/1-2, p. 149-154.

- (8) Styles, J.A. *et al.* (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, *Cytometry*, Vol. 44/2, p. 153-155.
- (9) Heddle, J.A. (1973), A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 18/2, p. 187-190.
- (10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 31/1, p. 9-15.
- (11) Heddle, J.A. *et al.* (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 123/1, p. 61-118.
- (12) Mavournin, K.H. *et al.* (1990), The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 239/1, p. 29-80.
- (13) MacGregor, J.T. *et al.* (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, *Developments in Toxicology Environmental Science*, Vol. 11, p. 555-558.
- (14) MacGregor, J.T. *et al.* (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 189/2, p. 103-112.
- (15) MacGregor, J.T. *et al.* (1990), The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, *Fundamental and Applied Toxicology*, Vol. 14/3, p. 513-522.
- (16) Hayashi, M. *et al.* (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 245/4, p. 245-249.
- (17) CSGMT/JEMS.MMS – The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 278/23, p. 83-98.
- (18) CSGMT/JEMS.MMS – The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), *Mutagenesis*, Vol. 10/3, p. 153-159.
- (19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 23/4, p. 239-273.
- (20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 453/1, p. 45-50.
- (21) Hayes, J. *et al.* (2009), The rat bone marrow micronucleus test—study design and statistical power, *Mutagenesis*, Vol. 24/5, p. 419-424.
- (22) Wakata, A. *et al.* (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 32/1, p. 84-100.
- (23) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

- (24) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, p. 87-90.
- (25) Rothfuss, A. *et al.* (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 723/2, p. 108-120.
- (26) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, p. 293-304.
- (27) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, p. 313-319.
- (28) OECD (2000), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.
- (29) LeBaron, M.J. *et al.* (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 54/3, p. 222-228.
- (30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, Vol. 10/4, p. 313-319.
- (31) Hayashi, M. *et al.* (2000), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35/3, p. 234-252.
- (32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 390/1-2, p. 79-83.
- (33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 413/1, p. 7-14.
- (34) Spencer, P.J. *et al.* (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, Toxicological Sciences, Vol. 97/1, p. 120-127.
- (35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Research Letters, Vol. 120/4, p. 241-247.
- (36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, Mutation Research, Vol. 120/4, p. 269-275.
- (37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 213/1, p. 91-104.
- (38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, Mutation Research, Vol. 439/1, p. 121-126.
- (39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, Mutagenesis, Vol. 5/4, p. 411-415.
- (40) Miller, B.M. *et al.* (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, Vol. 6/4, p. 297-302.

-
- (41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, *American Journal of Medical Genetics*, Vol. 107/2, p. 99-104.
- (42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 347/2, p. 97-99.
- (43) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.
- (44) Richold, M. *et al.* (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays”, in *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*, Kirkland, D. J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, p. 115-141.
- (45) Lovell, D.P. *et al.* (1989), „Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays”, in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, p. 184-232.
- (46) Hayashi, M. *et al.* (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 102/Suppl 1, p. 49-52.
- (47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 469/2, p. 233-241.
-

Apendicele 1

DEFINIȚII

Centromer: Regiune (regiuni) dintr-un cromozom care, în timpul diviziunii celulare, este (sunt) legată(e) de fibrele fusului, ceea ce permite deplasarea ordonată a cromozomilor fiice către polii celulelor fiice.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Eritoblast: Un stadiu incipient de dezvoltare a eritrocitelor, care precede imediat eritrocitele imature, în cazul în care celula conține încă un nucleu.

Kinetocor: Structură proteică ce se formează pe centromerul celulelor eucariote, care leagă cromozomul de polimerii microtubulilor din fusul mitotic în timpul mitozei și meiozei și funcționează în timpul diviziunii celulare pentru a separa cromatidele surori.

Micronuclee: Nuclee mici, separate de nucleele principale ale celulelor și prezente în plus față de acestea, produse în timpul telofazei mitozei (meioză) de către fragmentele de cromozomi sau de cromozomii întregi întârziați.

Eritrocit monocromatic sau matur: Un eritrocit complet matur care a pierdut ARN-ul rezidual rămas în urma cariolizei și/sau care a pierdut markerii celulari cu durată scurtă de viață care dispar în mod caracteristic după carioliza ce urmează după diviziunea finală a eritroblastului.

Eritrocit policromatic sau imatur: Un eritrocit nou-format într-un stadiu intermediar de dezvoltare care se colorează atât cu componentele albastre, cât și cu cele roșii ale colorației clasice a sângelui precum colorația Wright Giemsa datorită prezenței ARN-ului rezidual în celula nou-formată. Aceste celule nou-formate sunt aproximativ identice cu reticulocitele, care sunt vizualizate utilizând o colorație vitală ce cauzează ca ARN-ul rezidual să se aglutineze într-un reticul. Alte metode, inclusiv colorația monocromatică de ARN cu coloranți fluorescenți sau etichetarea markerilor de suprafață cu o durată de viață scurtă precum CD71 cu anticorpi fluorescenți sunt utilizate frecvent în prezent pentru a identifica celula roșie nou-formată. Eritrocitele policromatice, reticulocitele și eritrocitele CD71 pozitiv sunt toate eritrocite imature, cu toate că fiecare dintre acestea are o distribuție ușor diferită a vârstei.

Reticulocit: Un eritrocit nou-format, colorat cu o colorație vitală, ce cauzează ca ARN-ul rezidual celular să se aglutineze într-un reticul caracteristic. Reticulocitele și eritrocitele policromatice au o distribuție a vârstei celulare asemănătoare.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testate utilizând această metodă de testare.

Apendicele 2

MODELUL FACTORIAL PENTRU IDENTIFICAREA DIFERENȚELOR ÎNTRE SEXE ÎN TESTUL IN VIVO DE MICRONUCLEU**Modelul factorial și analiza acestuia**

În acest model, se testează un minim de 5 masculi și 5 femele la fiecare nivel de concentrație, rezultând un model de testare care utilizează un minim de 40 de animale (20 de masculi și 20 de femele, plus martori pozitivi relevanți).

Acest model, care este unul dintre cele mai simple modele factoriale, este echivalent cu o analiză bidirecțională a varianței, având ca efecte principale sexul și nivelul de concentrație. Datele pot fi analizate utilizând numeroase pachete software standard pentru statistici cum ar fi SPSS, SAS, STATA, Genstat, precum și utilizând R.

Analiza împarte variabilitatea setului de date în cea dintre sexe, cea dintre concentrații și cea referitoare la interacțiunea dintre sexe și concentrații. Se testează fiecare dintre termeni în raport cu o estimare a variabilității între animalele replică în cadrul grupelor de animale de același sex la aceeași concentrație. Detalii complete privind metodologia de bază sunt disponibile în numeroase manuale statistice standard (a se vedea referințele) și în secțiunea „Ajutor” pusă la dispoziție odată cu pachetele statistice.

Analiza se desfășoară prin inspectarea condiției de interacțiune a concentrației sexului x în tabelul ANOVA ⁽¹⁾. În absența unei durate semnificative de interacțiune, valorile combinate între sexe sau valorile combinate între nivelurile de concentrație furnizează teste statistice valabile între niveluri pe baza duratei de variabilitate reunite în cadrul grupului.

Analiza continuă prin divizarea estimării variabilității dintre concentrații în contraste care furnizează un test de contraste lineare și pătratic ale răspunsurilor între nivelurile de concentrație. În cazul în care există o interacțiune semnificativă a concentrației sexului x, această condiție poate fi împărțită, de asemenea, în contraste de interacțiune liniară a sexului x și contraste de interacțiune pătratică a sexului x. Aceste condiții furnizează teste ale faptului dacă răspunsurile de concentrație sunt paralele pentru cele două sexe sau există un răspuns diferențiat între cele două sexe.

Estimarea variabilității reunite în cadrul grupului poate fi utilizată pentru a furniza teste pe perechi cu privire la diferența dintre valorile medii. Aceste comparații ar putea fi efectuate între valorile medii pentru cele două sexe și între valorile medii pentru nivelurile diferite de concentrație, precum cele pentru comparații cu nivelurile de martori negativi. În cazurile în care există o interacțiune semnificativă, se pot efectua comparații între valorile medii de concentrații diferite pentru un sex sau între valorile medii ale sexelor la aceeași concentrație.

Referințe

Există numeroase manuale statistice care tratează teoria, conceperea, metodologia, analiza și interpretarea modelelor factoriale, variind de la analizele cele mai simple cu doi factori la forme mai complexe utilizate în metodologia de „concepere a experimentelor”. În continuare este prezentată o listă neexhaustivă. Unele cărți oferă exemple de modele comparabile, în unele cazuri cu codul pentru efectuarea analizelor utilizând diferite pachete software.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

⁽¹⁾ Statisticienii care adoptă o abordare bazată pe modelare precum utilizarea modelelor liniare generalizate (GLM) pot aborda analiza într-o manieră diferită, dar comparabilă, dar acest lucru nu va deriva în mod necesar din tabelul anova tradițional, care datează de la abordările algoritmice pentru calculul statisticilor, dezvoltate în epoca de dinaintea computerului.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.”

- (6) În partea B, capitolul B.15. se elimină.
- (7) În partea B, capitolul B.16. se elimină.
- (8) În partea B, capitolul B.18. se elimină.
- (9) În partea B, capitolul B.19. se elimină.
- (10) În partea B, capitolul B.20. se elimină.
- (11) În partea B, capitolul B.24. se elimină.
- (12) În partea B, capitolul B.47. se înlocuiește cu următorul text:

„B.47 Metoda de testare a opacității și permeabilității corneene la bovine pentru identificarea i) substanțelor chimice care produc lezarea oculară gravă și a ii) substanțelor chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă

INTRODUCERE

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 437 (2013). Metoda de testare a opacității și permeabilității corneene la bovine (BCOP) a fost evaluată de Comitetul de coordonare la nivel de agenții privind validarea metodelor alternative (ICCVAM), în colaborare cu Centrul european pentru validarea metodelor alternative (ECVAM) și Centrul Japonez pentru validarea metodelor alternative (JaCVAM) în anii 2006 și 2010 (1) (2). În cadrul primei evaluări, metoda de testare BCOP a fost evaluată pentru utilitatea acesteia la identificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) care provoacă leziuni oculare grave (1). În cadrul celei de a doua evaluări, metoda de testare BCOP a fost evaluată pentru utilitatea acesteia la identificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) care nu sunt clasificate în ceea ce privește iritarea oculară sau lezarea oculară gravă (2). Baza de date de validare BCOP a fost constituită din 113 substanțe și 100 de amestecuri în total (2) (3). În urma acestor evaluări și a revizuirii lor inter pares s-a concluzionat faptul că metoda de testare poate identifica în mod corect substanțele chimice (atât substanțe, cât și amestecuri) care provoacă lezarea oculară gravă (categoria 1), precum și substanțele care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă, astfel cum este definit de Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS) al Organizației Națiunilor Unite (ONU) (4) și de Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ⁽¹⁾ și, prin urmare, a fost declarată valabilă din punct de vedere științific pentru ambele scopuri. Lezarea oculară gravă reprezintă producerea de leziuni tisulare la ochi sau deteriorarea fizică gravă a vederii, în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care nu este complet reversibilă într-un interval de 21 de zile de la aplicare. Substanțele chimice de testat care provoacă leziuni oculare grave sunt clasificate în categoria 1 din GHS al ONU. Substanțele chimice care nu sunt clasificate în ceea ce privește iritația oculară sau lezarea oculară gravă sunt definite ca fiind cele care nu îndeplinesc cerințele pentru clasificarea în categoria 1 sau 2 (2A sau 2B) din GHS al ONU, și anume, cele menționate în „nicio categorie” din GHS al ONU. Prezenta metodă de testare include utilizarea și limitele recomandate pentru metoda de testare BCOP pe baza evaluărilor acesteia. Principalele diferențe dintre versiunea originală din anul 2009 și versiunea actualizată din anul 2013 ale Orientării OCDE privind testarea includ, dar nu sunt limitate la: utilizarea metodei de testare BCOP pentru a identifica substanțele chimice care nu necesită clasificare conform GHS al ONU (punctele 2 și 7); clasificările aplicabilității metodei de testare BCOP la testarea alcoolilor, cetonele și substanțelor solide (punctele 6 și 7) și a substanțelor și a amestecurilor (punctul 8); clasificări ale modalităților de testare a substanțelor tensioactive sau a amestecurilor care conțin surfactanți (punctul 28); actualizări și clarificări cu privire la martorii pozitivi (punctele 39 și 40); o actualizare a criteriilor de decizie ale metodei de testare BCOP (punctul 47); o actualizare a criteriilor de acceptare a studiului (punctul 48); o actualizare a elementelor raportului de testare (punctul 49); o actualizarea a apendicelui 1 cu privire la definiții; adăugarea apendicelui 2 pentru capacitatea predictivă a metodei de testare BCOP în diferite sisteme de clasificare; o actualizarea a apendicelui 3 cu privire la lista substanțelor chimice de verificare; și o actualizare a apendicelui 4 cu privire la suportul cornean BCOP (punctul 1) și opacimetru (punctele 2 și 3).

⁽¹⁾ Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353, 31.12.2008, p. 1.

În prezent, este general acceptat faptul că, în viitorul apropiat, niciun test *in vitro* de iritație oculară nu va putea înlocui testul ocular *in vivo* Draize pentru efectuarea de predicții în cadrul întregii game de iritații pentru diferite clase de substanțe chimice. Cu toate acestea, combinații strategice de mai multe metode de testare alternative în cadrul unei strategii de testare (secvențiale) ar putea înlocui testul ocular Draize (5). Abordarea descendentă (5) este concepută pentru a fi utilizată în cazul în care, pe baza informațiilor existente, se preconizează că o substanță chimică are potențial iritant ridicat, în timp ce abordarea ascendentă (5) este concepută pentru a fi utilizată în cazul în care, pe baza informațiilor existente, se preconizează că o substanță chimică nu cauzează iritație oculară suficientă pentru a necesita o clasificare. Metoda de testare BCOP este o metodă de testare *in vitro* care poate fi utilizată, în anumite circumstanțe și cu limitări specifice, pentru clasificarea pericolelor la nivel ocular și pentru etichetarea substanțelor chimice. Cu toate că nu este considerată valabilă ca metodă de testare de sine stătătoare de substituie a testului *in vivo* pe ochi de iepure, metoda de testare BCOP este recomandată ca o etapă inițială în cadrul unei strategii de testare precum abordarea descendentă propusă de către Scott *et al.*(5) pentru a identifica substanțele chimice care provoacă lezarea oculară gravă, și anume substanțele chimice care urmează să fie clasificate în categoria 1 din GHS al ONU fără testare suplimentară (4). Metoda de testare BCOP este recomandată, de asemenea, pentru a identifica substanțele chimice care nu necesită clasificare în ceea ce privește iritația oculară sau lezarea oculară gravă, astfel cum este definit de GHS al ONU („nicio categorie” din GHS al ONU) (4) în cadrul unei strategii de testare precum abordarea ascendentă (5). Cu toate acestea, o substanță chimică care nu se preconizează să cauzeze lezare oculară gravă sau care nu este clasificată pentru iritație oculară/lezare oculară gravă prin metoda de testare BCOP ar necesita teste suplimentare (*in vitro* și/sau *in vivo*) pentru a se stabili o clasificare definitivă.

Scopul acestei metode de testare este de a descrie procedurile utilizate pentru a evalua potențialul pericolelor la nivel ocular al unei substanțe chimice de testat, măsurat prin capacitatea acesteia de a provoca opacitate sau permeabilitate crescută a unei corneei izolate de bovină. Efectele toxice la nivelul corneei sunt măsurate prin: (i) scăderea transmisiei luminii (opacitate) și (ii) creșterea pătrunderii colorantului fluoresceină sodică (permeabilitate). Evaluarea opacității și permeabilității corneei după expunerea la o substanță chimică de testat se combină pentru a deduce un scor privind iritarea *in vitro* (IVIS) care se utilizează pentru clasificarea nivelului de iritabilitate a substanței chimice de testat.

Definițiile sunt prevăzute în apendicele 1.

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITĂRI

Această metodă de testare are la bază protocolul metodei de testare BCOP al ICCVAM (6) (7) care a fost dezvoltat inițial din informații obținute din protocolul Institutului pentru științe *in vitro*- IIVS) și Protocolul 124 al INVITTOX (8). Acestea din urmă reprezintă protocolul utilizat pentru studiul de prevalidare sponsorizat de Comunitatea Europeană și efectuat în perioada 1997-1998. Cele două protocoale se bazează pe metoda de testare BCOP raportată pentru prima dată de către Gautheron *et al.*(9).

Metoda de testare BCOP poate fi utilizată pentru a identifica substanțele chimice care provoacă leziuni oculare grave, astfel cum sunt definite de GHS al ONU, și anume substanțele chimice clasificate în categoria 1 din GHS al ONU (4). Atunci când este utilizată în acest scop, metoda de testare BCOP are o precizie generală de 79 % (150/191), o rată de rezultate fals pozitive de 25 % (32/126) și o rată de rezultate fals negative de 14 % (9/65) în comparație

cu datele privind metoda de testare *in vivo* pe ochi de iepure clasificate conform sistemului de clasificare GHS al ONU (3) (a se vedea appendicele 2 tabelul 1). Atunci când substanțele chimice de testat din cadrul anumitor clase de substanțe chimice (și anume, alcooli, cetone) sau fizice (și anume, substanțe solide) sunt excluse din baza de date, metoda de testare BCOP are o precizie generală de 85 % (111/131), o rată de rezultate fals pozitive de 20 % (16/81) și o rată de rezultate fals negative de 8 % (4/50) în ceea ce privește sistemul de clasificare GHS al ONU (3). Eventualele deficiențe ale metodei de testare BCOP atunci când este utilizată pentru a identifica substanțe chimice care provoacă leziuni oculare grave (categoria 1 din GHS al ONU) se datorează ratei ridicate de rezultate fals pozitive pentru alcooli și cetone și ratei ridicate de rezultate fals negative pentru substanțele solide observate în baza de date de validare (1) (2) (3). Cu toate acestea, având în vedere faptul că nu toți alcoolii și cetonele sunt supraestimați prin metoda de testare BCOP și unii sunt corect preconizați drept categoria 1 din GHS al ONU, aceste două grupe funcționale organice nu sunt considerate a fi în afara domeniului de aplicabilitate a metodei de testare. Revine utilizatorului acestei metode de testare să decidă dacă o posibilă supraestimare a unui alcool sau a unei cetone poate fi acceptată sau este necesară efectuarea de teste suplimentare într-o abordare pe baza forței probante. În ceea ce privește ratele de rezultate fals negative pentru substanțele solide, se remarcă faptul că substanțele solide pot conduce la condiții de expunere variabile și extreme în testul Draize de iritație oculară *in vivo*, care pot rezulta în predicții irelevante ale adevăratului lor potențial iritant (10). De asemenea, se remarcă faptul că niciunul dintre rezultatele fals negative identificate în baza de date de validare ICCVAM (2) (3), în contextul identificării substanțelor chimice care provoacă lezarea oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU), nu au condus la o valoare a IVIS ≤ 3 , care este criteriul utilizat pentru a identifica o substanță chimică de testat ca încadrându-se în „nicio categorie” din GHS al ONU. În plus, rezultatele fals negative ale BCOP nu sunt critice în acest context, având în vedere faptul că toate substanțele chimice care produc o valoare $3 < \text{IVIS} \leq 55$ ar fi testate ulterior în cadrul altor teste *in vitro* validate în mod corespunzător sau, ca o ultimă opțiune, la iepuri, în funcție de cerințele de reglementare, cu ajutorul unei strategii de testare secvențiale cu o abordare pe baza forței probante. Având în vedere faptul că unele substanțe chimice solide sunt corect estimate prin metoda de testare BCOP în categoria 1 din GHS al ONU, această stare fizică nu este considerată, de asemenea, a fi încadrată în afara domeniului de aplicabilitate a metodei de testare. Inspectorii ar putea avea în vedere utilizarea acestei metode de testare pentru toate tipurile de substanțe chimice, prin care o valoare a IVIS ≥ 55 se acceptă ca indicator al unui răspuns care provoacă lezarea oculară gravă ce trebuie clasificată în categoria 1 din GHS al ONU fără testări suplimentare. Cu toate acestea, astfel cum s-a menționat deja, rezultatele pozitive obținute cu ajutorul alcoolilor sau cetonele se interpretează cu prudență având în vedere potențialul de supraestimare.

Metoda de testare BCOP pot fi utilizată, de asemenea, pentru a identifica substanțe chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă în temeiul sistemului de clasificare GHS al ONU (4). Atunci când este utilizată în acest scop, metoda de testare BCOP are o precizie generală de 69 % (135/196), o rată de rezultate fals pozitive de 69 % (61/89) și o rată de rezultate fals negative de 0 % (0/107) în comparație cu datele privind metoda de testare *in vivo* pe ochi de iepure clasificate conform sistemului de clasificare GHS al ONU (3) (a se vedea appendicele 2 tabelul 2). Rata de rezultate fals pozitive obținută [substanțele chimice din „nicio categorie” a GHS al ONU care produc o valoare a IVIS > 3 *in vivo*, a se vedea punctul 47) este în mod considerabil ridicată, dar nu critică în acest context, având în vedere faptul că toate substanțele chimice care produc o valoare $3 < \text{IVIS} \leq 55$ ar fi testate ulterior în cadrul altor teste *in vitro* validate în mod corespunzător sau ca o ultimă opțiune, pe iepuri, în funcție de cerințele de reglementare, cu ajutorul unei strategii de testare secvențiale cu o abordare pe baza forței probante a datelor. Metoda de testare nu prezintă deficiențe specifice în ceea ce privește testarea alcoolilor, cetonele și substanțelor solide atunci când scopul este identificarea substanțelor chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă („nicio categorie” a GHS al ONU) (3). Inspectorii ar putea avea în vedere utilizarea acestei metode de testare pentru toate tipurile de substanțe chimice, prin care un rezultat negativ (IVIS ≤ 3) se acceptă drept indicator al faptului că nu este necesară clasificarea („nicio categorie” a GHS al ONU). Întrucât metoda de testare BCOP nu poate identifica în mod corect decât 31 % din substanțele chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă, această metodă de testare nu trebuie să fie considerată prima opțiune pentru a iniția o abordare ascendentă (5) în cazul în care sunt disponibile alte metode *in vitro* validate și acceptate cu același grad ridicat de sensibilitate, dar un grad mai ridicat de specificitate.

Baza de date de validare BCOP a fost constituită din 113 substanțe și 100 de amestecuri în total (2) (3). Metoda de testare BCOP este considerată, prin urmare, ca fiind aplicabilă pentru testarea atât a substanțelor, cât și a amestecurilor.

Metoda de testare BCOP nu este recomandată pentru identificarea substanțelor chimice de testat care sunt clasificate drept iritante la nivel ocular (categoria 2 din GHS al ONU sau categoria 2A) sau substanțele chimice de testat care sunt clasificate drept ușor iritante la nivel ocular (categoria 2B din GHS al ONU), având în vedere numărul considerabil de substanțe chimice din categoria 1 din GHS al ONU clasificate insuficient drept categoria 2, 2A sau 2B și substanțe chimice din categoria „nicio categorie” din GHS al ONU clasificate excesiv drept categoria 2, 2A sau 2B din GHS al ONU (2) (3). În acest scop, ar putea fi necesare teste suplimentare utilizând o altă metodă adecvată.

Toate procedurile care utilizează ochi și cornee de bovine trebuie să respecte reglementările și procedurile aplicabile ale instalației de testare cu privire la manipularea materialelor de origine animală, care includ țesuturile și fluidele tisulare, fără a se limita la acestea. Se recomandă măsurile de precauție universale aplicabile în laboratoare (11).

Cu toate că metoda de testare BCOP nu ia în considerare leziunile conjunctivale și iridiane, aceasta abordează efectele asupra corneei, care sunt principalul motor de clasificare *in vivo* atunci când se ia în considerare clasificarea GHS al ONU. Reversibilitatea leziunilor corneene nu poate fi evaluată în mod separat prin metoda de testare BCOP. Pe baza studiilor pe ochi de iepure, s-a propus posibila utilizare a unei evaluări a adâncimii inițiale a leziunii corneene pentru a identifica unele tipuri de efecte ireversibile (12). Cu toate acestea, sunt necesare cunoștințe științifice suplimentare pentru a înțelege modul în care se produc efectele ireversibile care nu sunt legate de leziunea inițială de nivel ridicat. În sfârșit, metoda de testare BCOP nu permite evaluarea toxicității sistemice potențiale asociate expunerii oculare.

Această metodă de testare va fi actualizată periodic, pe măsură ce se iau în considerare noi informații și date. De exemplu, histopatologia ar putea fi utilă atunci când este necesară o caracterizare mai cuprinzătoare a leziunilor corneene. Astfel cum este subliniat în documentul de orientare nr. 160 al OCDE (13), utilizatorii sunt încurajați să păstreze corneele și să pregătească speciemenle histopatologice care pot fi utilizate pentru a dezvolta o bază de date și criterii de decizie care pot îmbunătăți în continuare acuratețea acestei metode de testare.

Orice laborator care utilizează pentru prima dată această metodă de testare trebuie să utilizeze substanțele chimice de verificare prevăzute în apendicele 3. Un laborator poate utiliza respectivele substanțe chimice pentru a-și demonstra performanțele tehnice în ceea ce privește aplicarea metodei de testare BCOP, înainte de trimiterea datelor metodei de testare BCOP în scopul clasificării reglementare a pericolelor.

PRINCIPIUL TESTULUI

Metoda de testare BCOP este un model organotipic care permite menținerea pe termen scurt a funcțiilor fiziologice și biochimice normale ale corneei bovine *in vitro*. În cadrul acestei metode de testare, leziunea provocată de substanța chimică de testat este evaluată prin măsurătorile cantitative ale modificărilor opacității și permeabilității corneene cu ajutorul unui opacimetru și, respectiv, al unui spectrofotometru în lumină vizibilă. Ambele măsurători sunt utilizate pentru a calcula un IVIS, care este utilizat pentru a desemna o categorie de clasificare a pericolelor *in vitro* pentru anticiparea potențialului iritant la nivel ocular *in vivo* al unei substanțe chimice de testat (a se vedea criteriile de decizie la punctul 48).

Metoda de testare BCOP utilizează cornee izolate de la ochii bovinelor proaspăt sacrificate. Opacitatea corneană este determinată cantitativ prin măsurarea transmisiei luminii prin cornee. Permeabilitatea este determinată cantitativ prin măsurarea cantității de colorant fluoresceină sodică care străbate întreaga grosime a corneei, detectat în centrul camerei posterioare. Substanțele chimice de test sunt aplicate la nivelul suprafeței epiteliale a corneei prin adăugare în camera anterioară a suportului cornean. Apendicele 4 prezintă o descriere și o diagramă a unui suport cornean utilizat în metoda de testare BCOP. Suporturile corneene pot fi obținute comercial, din diferite surse sau pot fi confecționate.

Sursa și vârsta ochilor bovini și selectarea speciilor de animale

Bovinele trimise la abator sunt sacrificate în mod obișnuit pentru consumul uman sau în alte scopuri comerciale. Numai animalele sănătoase, considerate corespunzătoare pentru alimentația umană, sunt utilizate ca sursă de cornee pentru metoda de testare BCOP. Deoarece bovinele au o greutate care variază în limite largi în funcție de rasă, vârstă și sex, nu există o greutate recomandată pentru animale în momentul sacrificării.

Utilizarea ochilor de la animale de vârste diferite poate conduce la variații ale dimensiunilor corneene. Corneele cu un diametru orizontal > 30,5 mm și valori ale grosimii corneene centrale (CCT) $\geq 1100 \mu\text{m}$ sunt obținute, în general, de la bovine cu vârsta de peste opt ani, în timp ce corneele cu diametrul orizontal < 28,5 mm și CCT < $900 \mu\text{m}$ sunt obținute, în general, de la bovine cu vârsta sub cinci ani (14). Din această cauză, nu se utilizează de regulă ochi de la animale cu vârsta de peste 60 de luni. În mod obișnuit, nu au fost utilizați ochi de la bovine cu vârsta sub 12 luni deoarece acestea sunt în creștere, iar grosimea și diametrul corneei sunt în mod considerabil mai mici decât cele raportate pentru ochii proveniți de la bovine mature. Cu toate acestea, utilizarea corneelor de la animale tinere (și anume, cele cu vârsta cuprinsă între 6 și 12 luni) este permisă deoarece aceasta prezintă o serie de avantaje precum disponibilitatea sporită, un interval de vârstă mai limitat și riscuri diminuate în ceea ce privește expunerea potențială a lucrătorilor la encefalopatia bovină spongiformă (15). Având în vedere faptul că evaluarea suplimentară a efectului dimensiunii sau grosimii corneei asupra sensibilității la substanțe chimice corozive sau iritante ar fi utilă, utilizatorii sunt încurajați să raporteze vârsta estimativă și/sau greutatea animalelor de la care provin corneele utilizate într-un studiu.

Colectarea și transportul ochilor la laborator

Ochii se colectează de către angajații abatorului. Pentru a reduce la minim lezarea mecanică sau de altă natură a ochilor, aceștia se enuclează cât mai curând posibil după sacrificare și se păstrează la rece imediat după enucleere și în timpul transportului. Pentru a preveni expunerea ochilor la substanțe chimice cu potențial iritant, angajații abatorului nu trebuie să utilizeze detergenți la spălarea capului animalului.

Ochii se imersează complet în soluție salină echilibrată Hanks rece (HBSS), într-un recipient cu dimensiuni adecvate și se transportă la laborator într-un mod care să reducă la minim deteriorarea și/sau contaminarea bacteriană. Întrucât ochii sunt colectați în timpul procesului de sacrificare, aceștia ar putea fi expuși la sânge sau la alte substanțe biologice, inclusiv bacterii și alte microorganisme. Prin urmare, este important să se asigure reducerea la minim a riscului de contaminare [de exemplu, prin păstrarea în gheață a recipientului care conține ochii și prin adăugarea de antibiotice la HBSS utilizată la păstrarea ochilor în timpul transportului (de exemplu, penicilină în concentrație de 100 UI/ml și streptomycină, 100 $\mu\text{g/ml}$)].

Perioada de timp dintre colectarea ochilor și utilizarea corneelor în metoda de testare BCOP se reduce la minim (în mod normal, acestea se colectează și se utilizează în aceeași zi) și trebuie să se demonstreze că aceasta nu compromite rezultatele testării. Rezultatele au la bază criteriile de selecție a ochilor, precum și răspunsurile probelor martor pozitive și negative. Toți ochii utilizați pentru testare trebuie să provină din același grup de ochi colectați într-o anumită zi.

Criteriile de selecție a ochilor utilizați în metoda de testare BCOP

Ochii, odată ajunși la laborator, se examinează cu atenție pentru defecte, inclusiv opacitate crescută, zgârieturi și neovascularizare. Numai corneele care provin de la ochi lipsiți de asemenea defecte urmează să fie utilizate.

De asemenea, calitatea fiecărei corneee este evaluată în etape ulterioare ale analizei. Corneele care au o capacitate mai mare de șapte unități de opacitate sau echivalentă pentru opacimetru și suporturile corneene, utilizate după o perioadă de echilibrare inițială de o oră, se îndepărtează (NOTĂ: opacimetrul se calibrează cu standarde de opacitate care sunt utilizate pentru stabilirea unităților de opacitate, a se vedea apendicele 4).

Fiecare grup de tratament (substanță chimică de testat, martori pozitivi și negativi testați în paralel) constă în minim trei ochi. În metoda de testare BCOP se utilizează trei cornee în calitate de cornee martor negativ. Având în vedere faptul că toate corneele se excizează din globul integral și se montează în camerele corneene, există posibilitatea producerii de artefacte din cauza manipulării în ceea ce privește valorile opacității corneene individuale și ale permeabilității (inclusiv martorul negativ). În plus, valorile opacității și permeabilității pentru corneele martor negative sunt utilizate pentru a corecta valorile permeabilității și opacității corneene ale substanței chimice de testat tratate și cele ale martorului pozitiv tratat în calculele IVIS.

PROCEDURĂ

Pregătirea ochilor

Corneele fără defecte sunt disecate cu menținerea unei margini de 2 până la 3 mm de sclerotică pentru a contribui la manipularea ulterioară, luându-se precauții pentru a preveni lezarea epitelului și a endoteliului corneei. Corneele izolate sunt montate în suporturi corneene special proiectate care sunt compuse din compartimente anterioare și posterioare strâns legate de partea epitelială și, respectiv, de partea endotelială a corneei. Ambele camere sunt umplute cu un exces de mediu Eagle esențial minimal (EMEM) fără roșu fenol, preîncălzit (mai întâi camera posterioară), asigurându-se că nu se formează bule. Dispozitivul este apoi echilibrat la 32 ± 1 °C timp de cel puțin o oră, pentru a permite corneelor să se echilibreze cu mediul și, în măsura în care este posibil, să desfășoare o activitate metabolică normală (temperatura aproximativă a suprafeței corneene *in vivo* este de 32 °C).

După perioada de echilibrare, în ambele camere se adaugă EMEM fără roșu fenol proaspăt preîncălzit și se efectuează citirile nivelului de bază pentru opacitatea fiecărei corneee. Toate corneele care prezintă leziuni tisulare macroscopice (de exemplu, zgârieturi, pigmentare, neovascularizare) sau o opacitate mai mare decât șapte unități de opacitate sau echivalentă pentru opacimetru și suporturile corneene se îndepărtează. Se selectează cel puțin trei cornee drept cornee martor negativ (sau solvent). Corneele rămase sunt distribuite apoi în grupuri de tratament și grupuri martor pozitiv.

Deoarece căldura specifică a apei este mai mare decât cea a aerului, apa asigură condiții de temperatură pentru incubare mai stabile. Prin urmare, se recomandă utilizarea unei băi de apă pentru menținerea suportului corneean și a conținutului acestuia la temperatura de 32 ± 1 °C. Cu toate acestea, se pot utiliza, de asemenea, incubatoare cu aer, dacă se iau precauții pentru menținerea stabilității temperaturii (de exemplu, prin preîncălzirea suporturilor și a mediilor).

Aplicarea substanței chimice de testat

Se utilizează două protocoale de tratament diferite, unul pentru substanțele lichide și surfactanți (solizi sau lichizi) și altul pentru substanțe solide nesurfactante.

Substanțele lichide sunt testate în stare nediluată. În mod normal, substanțele semisolide, cremele și cerurile sunt testate în același mod ca și substanțele lichide. Substanțele surfactante pure sunt testate la o concentrație de 10 % g/v într-o soluție de 0,9 % clorură de sodiu, în apă distilată sau într-un alt solvent pentru care există dovezi că este lipsit de efecte adverse asupra sistemului testat. Pentru utilizarea de concentrații de diluție alternative este necesară furnizarea unei justificări adecvate. Amestecurile care conțin surfactanți se pot testa nediluate sau diluate la o concentrație corespunzătoare, în funcție de scenariul de expunere *in vivo* corespunzător. Pentru concentrația testată este necesară o justificare adecvată. Corneele se expun la substanțele lichide și la surfactanți timp de 10 minute. Utilizarea altor durate de expunere trebuie însoțită de o justificare științifică adecvată. A se vedea appendicele 1 pentru o definiție a surfactantului și a amestecului care conține surfactant.

În mod normal, substanțele solide nesurfactante sunt testate sub formă de soluții sau suspensii cu o concentrație de 20 % g/v într-o soluție de 0,9 % clorură de sodiu, în apă distilată sau într-un alt solvent pentru care există dovezi că este lipsit de efecte adverse asupra sistemului testat. În anumite circumstanțe și cu o justificare științifică adecvată, substanțele solide pot fi testate, de asemenea, în stare pură prin aplicarea directă pe suprafața corneeană, utilizând metoda camerei deschise (a se vedea punctul 32). Corneele sunt expuse la substanțele solide timp de patru ore, dar, la fel precum în cazul lichidelor sau al surfactanților, se pot utiliza durate de expunere alternative, cu o argumentare științifică corespunzătoare.

În funcție de natura fizică și de caracteristicile chimice (de exemplu, substanțe solide, lichide, vâscoase, comparativ cu lichide nevâscoase) ale substanței chimice de testat, se pot utiliza diferite metode de tratament. Factorul critic este să se asigure că substanța chimică de testat acoperă în mod adecvat suprafața epitelială și că aceasta este îndepărtată în mod corespunzător în timpul etapelor de spălare. În mod normal, pentru substanțele chimice de testat în stare lichidă nevâscoase sau ușor vâscoase se utilizează o metodă cu camera închisă, iar pentru substanțele chimice de testat în stare lichidă semivâscoase și vâscoase, precum și pentru substanțele solide pure se utilizează o metodă cu camera deschisă.

În cazul metodei cu camera închisă, prin orificiile de dozare de pe suprafața superioară a camerei se introduce în camera anterioară suficientă substanță chimică de testat (750 μ l) pentru a acoperi porțiunea epitelială a corneei, iar orificiile sunt sigilate ulterior cu ajutorul dopurilor camerei în timpul expunerii. Este important să se asigure expunerea fiecărei corneei la o substanță chimică de testat pentru o perioadă de timp adecvată.

În cazul metodei cu camera deschisă, inelul de fixare a ferestrei și fereastra de sticlă din camera anterioară sunt îndepărtate înainte de tratament. Substanța martor sau substanța chimică de testat (750 μ l sau substanță de testat în cantitate suficientă pentru a acoperi complet corneea) se aplică direct pe suprafața epitelială a corneei cu ajutorul unei micropipete. În cazul în care o substanță chimică de testat este dificil de pipetat, aceasta poate fi încărcată sub presiune într-o pipetă care funcționează pe principiul dezlocuirii pozitive pentru a asista dozarea. Vârful unei astfel de pipete este introdus în vârful de distribuție al seringii astfel încât materialul să poată fi încărcat sub presiune în vârful de dezlocuire. În mod simultan, pistonul seringii este eliberat pe măsură ce este tras în sus. În cazul în care la nivelul vârfului pipetei apar bule de aer, substanța chimică de testat este îndepărtată (expulzată) și procesul se repetă până când vârful se umple fără a exista bule de aer. Dacă este necesar, se poate utiliza o seringă normală (fără ac), întrucât aceasta permite măsurarea unui volum precis de substanță chimică de testat și o aplicare mai ușoară la nivelul suprafeței epiteliale a corneei. După dozare, fereastra de sticlă este înlocuită la nivelul camerei anterioare pentru a recrea un sistem închis.

Incubarea post-expunere

După perioada de expunere, se îndepărtează din camera anterioară substanța chimică de testat, substanța chimică martor negativ sau substanța chimică martor pozitiv, iar epitelul se spală de cel puțin trei ori (sau până când nu se mai constată vizual prezența substanței chimice de testat) cu EMEM (care conține roșu fenol). Pentru spălare se utilizează un mediu care conține roșu fenol deoarece schimbarea de culoare a acestui indicator poate fi monitorizată pentru determinarea eficienței spălării substanțelor de testare acide sau alcaline. Corneele se spală de mai mult de trei ori dacă roșul fenol este în continuare decolorat (galben sau purpuriu) sau dacă substanța chimică de testat este în continuare vizibilă. După ce mediul nu mai conține substanță chimică de testat, corneele se spală pentru ultima dată cu EMEM (fără roșu fenol). EMEM (fără roșu fenol) se utilizează pentru spălarea finală pentru a se asigura îndepărtarea substanței roșu fenol din camera anterioară înainte de măsurarea opacității. Camera anterioară se reumple apoi cu EMEM fără roșu fenol.

În cazul lichidelor sau al surfactanților, după spălare, corneele se incubează pentru o perioadă suplimentară de două ore la 32 ± 1 °C. Un interval post-expunere mai lung poate fi util în anumite circumstanțe și necesitatea acestuia va fi examinată de la caz la caz. Corneele tratate cu substanțe solide se spală amănunțit după o perioadă de expunere de patru ore, fără a fi necesară o incubație suplimentară.

Opacitatea și permeabilitatea fiecărei corneei se înregistrează la sfârșitul perioadei de incubare post-expunere, în cazul substanțelor lichide și al surfactanților și la sfârșitul unei perioade de expunere de patru ore în cazul substanțelor solide nesurfactante. De asemenea, fiecare cornee se examinează vizual, înregistrându-se observațiile pertinente (de exemplu, exfolierea țesuturilor, reziduuri de substanță chimică de testat, tipare de opacifiere neuniformă). Observațiile respective pot fi importante deoarece acestea se pot reflecta în variații ale citirilor opacimetrului.

Substanțe chimice martor

În fiecare experiment se includ martori negativi sau grupuri martor solvent/vehicul și martori pozitivi testați în paralel.

Atunci când se testează o substanță lichidă cu puritate de 100 %, în metoda de testare BCOP se include un martor negativ testat în paralel (de exemplu, soluție de clorură de sodiu 0,9 % sau apă distilată) pentru a putea detecta modificările nespecifice din sistemul testat și pentru a furniza un nivel de bază pentru criteriile finale ale testării. În plus, această metodă garantează faptul că nu va apărea o reacție de iritație din cauza condițiilor de analiză neadecvate.

Atunci când se testează o substanță lichidă diluată, un surfactant, sau o substanță solidă, în metoda de testare BCOP se include un grup martor solvent/vehicul pentru a putea detecta modificările nespecifice din sistemul testat și pentru a furniza un nivel de bază pentru punctele finale ale analizei. Se poate utiliza numai un solvent/vehicul pentru care nu există dovezi că are efecte adverse asupra sistemului testat.

O substanță chimică cunoscută pentru faptul că provoacă o reacție pozitivă se introduce în fiecare experiment ca martor pozitiv testat în paralel cu scopul de a verifica integritatea sistemului de testare și pentru desfășurarea corespunzătoare a acestuia. Cu toate acestea, pentru a garanta faptul că există posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției la martorul pozitiv, amplitudinea reacției iritante nu trebuie să fie excesivă.

Exemple de martori pozitivi pentru substanțele chimice de testat sunt etanol 100 % sau dimetilformamidă 100 %. Soluția de imidazol 20 % g/v într-o soluție de clorură de sodiu 0,9 % reprezintă un exemplu de martor pozitiv pentru substanțele chimice de testat în stare solidă.

Substanțele chimice etalon sunt utile pentru evaluarea potențialului iritant la nivel ocular al substanțelor chimice necunoscute din cadrul unei anumite clase de substanțe sau de produse sau pentru evaluarea potențialului iritant relativ al unei substanțe iritante la nivel ocular într-un interval specific de reacții iritante.

Caracteristici măsurate

Opacitatea se determină prin măsurarea luminii transmise prin corneea. Opacitatea corneeană este măsurată cantitativ cu ajutorul unui opacimetru, conducând la valori ale opacității măsurate pe o scară continuă.

Permeabilitatea este determinată prin măsurarea cantitativă a colorantului cu fluoresceină sodică care străbate toate straturile celulare corneene (și anume, epiteliul de pe suprafața exterioară a corneei prin endoteliul de pe suprafața interioară a corneei). Un ml de soluție de fluoresceină sodică (4 sau 5 mg/ml atunci când se testează substanțe lichide și surfactanți sau substanțe nesurfactante) se adaugă în camera anterioară a suportului corneean, care interferează cu porțiunea epitelială a corneei, iar camera posterioară, care interferează cu porțiunea endotelială a corneei, este umplută cu EMEM proaspăt. Suportul este apoi incubat în poziție orizontală timp de 90 ± 5 min la 32 ± 1 °C. Cantitatea de fluoresceină sodică care pătrunde în camera posterioară este măsurată cantitativ cu ajutorul unui spectrofotometru UV/VIS. Măsurătorile spectrofotometrice efectuate la 490 nm sunt înregistrate sub formă de valori ale densității optice (DO₄₉₀) sau ale absorbanței, care sunt măsurate pe o scară continuă. Valorile permeabilității fluoresceinei sunt determinate prin utilizarea valorilor DO₄₉₀ înregistrate de un spectrofotometru cu lumină vizibilă care folosește valoarea standard de 1 cm a lungimii traiectoriei.

Ca o variantă alternativă, se poate utiliza un cititor de plăci de microtitrare cu 96 de godeuri, cu condiția: (i) să se poată stabili domeniul linear al cititorului de plăci pentru determinarea valorilor DO₄₉₀ a fluoresceinei; și (ii) să se utilizeze volumul corect de mostre de fluoresceină în placa cu 96 de godeuri pentru a se obține valori ale DO₄₉₀ echivalente cu valoarea standard de 1 cm a lungimii traiectoriei [acest aspect ar putea necesita un godeu umplut complet (în mod obișnuit 360 μl)].

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea datelor

După corectarea valorilor opacității și ale permeabilității medii (DO₄₉₀) pentru valorile opacității de fundal și ale permeabilității martorului negativ DO₄₉₀, valorile medii ale opacității și ale permeabilității DO₄₉₀ pentru fiecare grup de tratament trebuie combinate într-o formulă dedusă în mod empiric pentru a calcula un scor privind iritarea *in vitro* (IVIS) pentru fiecare grup de tratament după cum urmează:

$$\text{IVIS} = \text{valoarea opacității medii} + (15 \times \text{valoarea permeabilității medii DO}_{490})$$

Sina *et al.* (16) au raportat că această formulă a fost dedusă în urma unor studii interne și între laboratoare. Datele generate pentru o serie de 36 de compuși într-un studiu realizat între laboratoare au fost supuse unei analize multivariante pentru a determina ecuația cea mai potrivită pentru datele *in vivo* și cele *in vitro*. Această analiză a fost efectuată de cercetători de la două companii diferite, care au obținut ecuații aproape identice.

Valorile opacității și ale ermeabilității se evaluează, de asemenea, în mod independent pentru a determina, prin utilizarea doar a uneia dintre cele două caracteristici (a se vedea criteriile de decizie) dacă o substanță chimică de testat a provocat coroziune sau iritație severă.

Criterii de decizie

Valorile limită IVIS pentru identificarea substanțelor chimice de testat care provoacă lezarea oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU) și substanțele chimice de testat care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă („nicio categorie” din GHS al ONU) sunt prezentate în continuare:

IVIS	GHS al ONU
≤ 3	Nicio categorie
$> 3; \leq 55$	Nu se poate prevedea
> 55	Categoria 1

Criterii de acceptare a studiului

Un test este considerat acceptabil în cazul în care pentru martorul pozitiv se obține o valoare IVIS cuprinsă în intervalul reprezentat de două deviații standard ale valorii medii actuale a martorilor testați anterior, care trebuie actualizată la fiecare trei luni sau de fiecare dată când un test care poate fi acceptat este efectuat în laboratoare în care testele sunt realizate rar (și anume, mai puțin de o dată pe lună). Reacțiile martorilor negativi sau cele ale grupului martor solvent/vehicul trebuie să conducă la valori ale opacității și permeabilității care sunt mai mici decât limitele superioare stabilite pentru valorile opacității și ale ermeabilității fundalului pentru corneele de bovine tratate cu martorii negativi sau cu grupurile martor solvent/vehicul respective. O singură serie de testare compusă din cel puțin trei corneea este suficientă pentru o substanță chimică de testat atunci când clasificarea este fără echivoc. Cu toate acestea, în cazul rezultatelor limită în prima serie de testare, se ia în considerare (dar nu este neapărat necesară) o a doua serie de testare, precum și o a treia serie în cazul unor rezultate IVIS medii discordante între primele două serii de testare. În acest context, un rezultat în prima serie de testare este considerat limită în cazul în care previziunile pe baza celor 3 corneea au fost neconcordante, astfel încât:

- 2 din cele 3 corneea au dat previziuni discordante din valoarea medie a tuturor celor 3 corneea SAU
- 1 din cele 3 corneea a dat o predicție discordantă din valoarea medie a tuturor celor 3 corneea ȘI rezultatul discordant a fost >10 unități IVIS din pragul limită de 55.
- În cazul în care noua serie de testare coroborează previziunea din prima serie de testare (pe baza valorii medii a IVIS), o decizie definitivă poate fi luată fără efectuarea de teste suplimentare. În cazul în care noua serie de testare conduce la o previziune neconcordantă cu testarea inițială (pe baza valorii medii a IVIS), se efectuează o a treia și ultimă serie de testare pentru a soluționa previziunile echivoce și pentru a clasifica substanța chimică de testat. Renunțarea la teste suplimentare pentru clasificare și etichetare este permisă în cazul în care oricare serie de testare are ca rezultat o predicție de categoria 1 din GHS al ONU.

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații, dacă acestea prezintă relevanță pentru desfășurarea studiului:

Substanțe chimice de testat și martor

- Denumire (denumiri) chimică(e), precum denumirea structurală utilizată de către Chemical Abstracts Service (CAS), urmată de alte denumiri, dacă se cunosc; numărul de înregistrare (Registry Number -RN) CAS, dacă se cunoaște;

- Purity and composition of the chemical substance to be tested/witness [in percent(e) of weight], in the measure in which this information is available;
- Physico-chemical properties such as physical state, volatility, pH, stability, chemical class, solubility in water which are relevant for the conduct of the study;
- Treatment of chemical substances to be tested/witness before the test, where appropriate (for example, heating, grinding);
- Stability, where known.

Informații referitoare la sponsor și la instalația de testare

- Name and address of the sponsor, of the testing facility and of the study director.

Condițiile metodei de testare

- Opacimeter used (for example, model and specification) and instrument settings;
- Information regarding calibration for the devices used for measuring opacity and permeability (for example, opacimeter and spectrophotometer) to ensure linearity of measurements;
- Type of support corneas used (for example, model and specifications);
- Description of other equipment used;
- Procedure used to ensure integrity (and name, precision and reliability) of the testing method in time (for example, periodic testing of chemical substances for verification).

Criteriile pentru un test acceptabil

- Acceptable ranges for positive and negative test results in parallel on the basis of previous data;
- Where appropriate, ranges for reference acceptable test results in parallel on the basis of previous data.

Colectarea și pregătirea ochilor

- Identification of the source of eyes (and name, unit where they were collected);
- Corneal diameter as a measure of age of the animals and suitability for testing;
- Conditions of storage and transport of eyes (for example, date and time of collection, period of time up to the start of testing, transport media and conditions of temperature, all antibiotics used);
- Preparation and mounting of corneas of bovine, including specifications regarding quality of these, temperature of support corneas and selection criteria of corneas used for testing.

Procedura de testare

- Number of duplicates used;
- Identity of positive and negative test results (where appropriate, also of the solvent and of the reference test results);
- Concentration (concentrations) of chemical substance to be tested, application, time of exposure and time of incubation post-exposure used;
- Description of evaluation and decision criteria used;
- Description of acceptance criteria of the study used;
- Description of any modifications to the testing procedure;
- Description of decision criteria used.

Rezultate

- Prezentarea sub formă de tabel a rezultatelor obținute cu fiecare probă testată [de exemplu, valorile opacității și ale DO490, precum și IVIS calculat pentru substanța chimică de testat și pentru martorii pozitivi negativi și etalon (dacă se includ), raportate sub formă de tabel, inclusiv datele din experimentele duplicate repetate, după caz, și valorile medii $\pm$ deviația standard pentru fiecare experiment];
- Descrierea altor efecte observate;
- Clasificarea GHS al ONU *in vitro* rezultată, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor

Concluzie

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report – *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponibil la: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm
- (2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC:National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>
- (3) OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189, OECD, Paris.
- (4) UN (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York and Geneva: United Nations. Disponibil la: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html
- (5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., and Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro* 24:1-9.
- (6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report – *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponibil la: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm
- (7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Disponibil la: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>
- (8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy, European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).
- (9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

- (10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20:78-81.
- (11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponibil la: [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>].
- (12) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.
- (13) OECD (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, No. 160. Adopted October 25, 2011. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- (14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.
- (15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on – Part I. *The Lancet* 349: 636-641.
- (16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26:20-31.
- (17) Capitolul B.5 din prezenta anexă, Irritație/coroziune oculară acută.
- (18) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponibil la: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].
- (19) OECD (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No. 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised in 1997).

Disponibil la: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

Apendicele 1

DEFINIȚII

Precizie: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele „relevanței” acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul „concordanță” pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare.

Substanță chimică etalon: O substanță utilizată chimică în calitate de standard pentru comparația cu o substanță chimică de testat. O substanță chimică etalon trebuie să aibă următoarele proprietăți: (i) sursă (surse) compatibilă(e) și sigură(e); (ii) asemănări structurale și funcționale cu clasa de substanțe chimice testată; (iii) caracteristici fizico-chimice cunoscute; (iv) date justificative privind efecte cunoscute și (v) influență cunoscută în intervalul de răspuns dorit.

Abordarea ascendentă: Abordare pe etape utilizată pentru o substanță chimică susceptibilă de a nu necesita clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă, care începe cu determinarea substanțelor chimice care nu necesită clasificare (rezultat negativ) din alte substanțe chimice (rezultat pozitiv).

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Corneea: Regiunea transparentă a părții anterioare a globului ocular care acoperă irisul și pupila și care permite luminii să pătrundă în interior.

Opacitate corneeană: Măsurarea gradului de opacitate a corneei după expunerea la o substanță chimică de testat. Opacitatea corneeană crescută este un indicator al unei leziuni a corneei. Opacitatea poate fi evaluată în mod subiectiv, astfel cum se procedează în cazul testului Draize pe ochi de iepure, sau în mod obiectiv, cu ajutorul unui instrument cum este „opacimetrul”.

Permeabilitatea corneeană: Măsurarea cantitativă a lezării epitelului cornean printr-o determinare a cantității de colorant fluoresceină sodică care străbate toate straturile celulare ale corneei.

Iritație oculară: Producerea de modificări la nivel ocular în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care sunt complet reversibile în termen de 21 de zile de la aplicare. Termen utilizat în paralel cu „efecte reversibile asupra ochiului” și „categoria 2 din GHS al ONU” (4).

Rată de rezultate fals negative: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind negative. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Rată de rezultate fals pozitive: Proporția tuturor substanțelor chimice negative identificate în mod fals printr-o metodă de testare ca fiind pozitive. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Pericol: Proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, un sistem sau o (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

Scor privind iritarea *in vitro* (IVIS): O formulă dedusă în mod empiric utilizată în metoda de testare BCOP în care valorile opacității medii și cele ale permeabilității medii pentru fiecare grup de tratament sunt combinate într-un scor *in vitro* unic pentru fiecare grup de tratament. $IVIS = \text{valoarea opacității medii} + (15 \times \text{valoarea permeabilității medii})$.

Efecte ireversibile asupra ochilor: A se vedea „lezare oculară gravă”.

Amestec: Un amestec sau o soluție compus(ă) din două sau mai multe substanțe, în care acestea nu intră în reacție (4).

Martor negativ: O probă duplicat netratată, care conține toate componentele sistemului testat. Această probă este analizată împreună cu probele tratate cu substanță chimică de testat și cu alte probe martor pentru a determina dacă solvenții interacționează cu sistemul testat.

Neclasificat: Substanțe chimice care nu sunt clasificate pentru iritația oculară (categoria 2, 2A sau 2B din GHS al ONU) sau lezarea oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU). Termen utilizat în paralel cu „nicio categorie” din GHS al ONU.

Opacimetru: Instrument utilizat pentru a măsura „opacitatea corneană” prin evaluarea cantitativă a transmisiei luminii prin corneă. Instrumentul tipic are două compartimente, fiecare dintre acestea fiind dotat cu propria sursă de lumină și propria celulă fotoelectrică. Unul dintre compartimente este utilizat pentru corneea tratată, iar cel de-al doilea servește pentru a calibra și a regla punctul de zero al instrumentului. Lumina care provine de la o lampă cu halogen este trimisă printr-un compartiment de control (o cameră goală fără ferestre sau lichid) la o celulă fotoelectrică și comparată cu lumina trimisă prin compartimentul experimental, care adăpostește camera care conține corneea, către o celulă fotoelectrică. Diferențele în lumina transmisă către celulele fotoelectrice se compară și valoarea numerică a opacității se afișează pe un ecran digital.

Martor pozitiv: O probă duplicat care conține toate componentele unui sistem testat și care a fost tratată cu o substanță chimică cunoscută pentru faptul că provoacă o reacție pozitivă. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu trebuie să fie excesiv de mare.

Efecte reversibile asupra ochilor: A se vedea „iritația oculară”.

Fiabilitate: Măsura în care o metodă de testare poate fi reprodusă în timp, în același laborator sau în laboratoare diferite, folosind același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau între laboratoare.

Lezarea oculară gravă: Producerea de leziuni tisulare la nivel ocular sau deteriorarea fizică gravă a vederii, în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care nu sunt complet reversibile într-un interval de 21 de zile de la aplicare. Termen utilizat în paralel cu „efecte ireversibile asupra ochilor” și cu „categoria 1 din GHS al ONU” (4).

Martor solvent/vehicul: O probă netratată care conține toate componentele sistemului testat, inclusiv solventul sau vehiculul care este analizat împreună cu probele tratate cu substanța chimică de testat și cu alte probe martor pentru a stabili nivelul de bază al reacției pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată în același solvent sau vehicul. În plus, atunci când este testată în paralel cu un martor negativ, această probă indică dacă solventul sau vehiculul interacționează cu sistemul testat.

Substanță: Elemente chimice și compuși lor în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a menține stabilitatea produsului și orice impuritate rezultată din procesul utilizat, dar cu excepția oricărui solvent care poate fi separat fără a influența stabilitatea substanței sau fără a schimba compoziția acesteia (4).

Surfactant: Denumit, de asemenea, agent cu activitate de suprafață, acesta este o substanță, cum ar fi un detergent, care poate reduce tensiunea superficială a unui lichid și, prin urmare, permite producerea spumei sau pătrunderea substanțelor solide; este cunoscut, de asemenea, ca agent tensioactiv.

Amestec care conține surfactant: În contextul acestei metode de testare, acesta este un amestec care conține una sau mai mulți surfactanți cu o concentrație finală >5 %.

Abordare descendentă: Abordare pe etape utilizată pentru o substanță chimică susceptibilă de a provoca lezarea oculară gravă, care începe cu determinarea substanțelor chimice care provoacă lezarea oculară gravă (rezultat pozitiv) față de alte substanțe chimice (rezultat negativ).

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare de testare.

Strategie de testare secvențială: O strategie de testare pe etape în care toate informațiile existente cu privire la o substanță chimică de testat sunt revizuite, într-o anumită ordine, utilizând un proces al forței probante în fiecare etapă pentru a determina dacă sunt disponibile suficiente informații pentru o decizie privind clasificarea riscurilor, înainte de a trece la etapa următoare. În cazul în care potențialul iritant al unei substanțe chimice de testat poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, nu este necesară o testare suplimentară. În cazul în care potențialul iritant al unei substanțe chimice de testat nu poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, o procedură de testare secvențială pe animale se efectuează până în momentul în care se poate realiza o clasificare lipsită de echivoc.

Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pericole pentru sănătate și pericole pentru mediu, și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, de exemplu pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de siguranță pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului (4).

Categoria 1 din GHS al ONU: A se vedea „lezarea oculară gravă”.

Categoria 2 din GHS al ONU: A se vedea „iritația oculară”.

„Nicio categorie” din GHS al ONU: Substanțe chimice care nu îndeplinesc cerințele pentru clasificare corespunzătoare categoriei 1 sau 2 (2A sau 2B) din GHS al ONU. Termen utilizat în paralel cu „neclasificat”.

Metodă de testare validată: Metodă de testare pentru care au fost completate studii de validare pentru a determina relevanța (inclusiv precizia) și fiabilitatea pentru un anumit scop. Este important de semnalat că este posibil ca performanțele unei metode de testare validate să nu fie suficiente din punct de vedere al preciziei și fiabilității pentru ca aceasta să fie considerată acceptabilă pentru scopul propus.

Forța probantă: Procesul prin care se iau în considerare punctele tari și punctele slabe ale unor informații diverse pentru a formula și a susține o concluzie în ceea ce privește potențialul de pericol al unei substanțe chimice de testat.

Apendicele 2

CAPACITATEA DE ESTIMARE A METODEI DE TESTARE BCOP

Tabelul 1

Capacitatea de estimare a BCOP pentru identificarea substanțelor chimice care provoacă lezarea oculară gravă [cat. 1 vs nu cat. 1 (cat. 2 + nicio cat.) din GHS al ONU/ Regulamentul CLP al UE; cat. I vs nu cat. I (cat. II+ cat. III+ cat. IV) EPA SUA]

Clasifi- care Sistem	Nr.	Precizie		Sensibilitate		Rezultate fals negative		Specificitate		Rezultate fals pozitive	
		%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.
GHS al ONU Regula- mentul CLP al UE	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
EPA SUA	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Tabelul 2

Capacitatea de estimare a BCOP pentru identificarea substanțelor chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă („substanțe cu caracter neiritant”) [nicio cat. vs nu cat. „nicio cat.” (cat. 1 + cat. 2) din GHS al ONU/Regulamentul CLP al UE; cat. IV vs nu cat. IV (cat. 1 + cat. 2 + cat. 3) EPA SUA]

Clasifi- care Sistem	Nr.	Precizie		Sensibilitate		Rezultatele fals negative		Specificitate		Rezultate fals pozitive	
		%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.
GHS al ONU Regula- mentul CLP al UE	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
EPA SUA	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

Apendicele 3

SUBSTANȚE CHIMICE DE VERIFICARE PENTRU METODA DE TESTARE BCOP

Înainte de utilizarea sistematică a acestei metode de testare, laboratoarele trebuie să demonstreze performanțele tehnice proprii prin identificarea corectă a clasificării riscurilor oculare ale celor 13 substanțe chimice recomandate în tabelul 1. Substanțele respective au fost selectate pentru a reprezenta intervalul de reacții pentru pericolele la nivel ocular pe baza rezultatelor furnizate de testul *in vivo* pe ochi de iepure (TG 405) (17) și sistemul de clasificare GHS al ONU (și anume, categoriile 1, 2A, 2B, sau neclasificat) (4). Alte criterii de selecție au fost disponibilitatea comercială a substanțelor chimice, existența datelor de referință *in vivo* de calitate superioară și existența datelor *in vitro* de calitate superioară furnizate de metoda de testare BCOP. Informațiile de referință sunt disponibile în registrul SSD (3) și în documentul ICCVAM de trecere în revistă a cadrului general pentru metoda de testare BCOP (2) (18).

Tabelul 1

Substanțe recomandate pentru a demonstra performanțele tehnice prin metoda de testare BCOP

Substanță chimică	NR. CAS	Clasă chimică ⁽¹⁾	Forma fizică	Clasificare <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Clasificare BCOP
Clorură de benzalconiu (5 %)	8001-54-5	Compus de tip onium	Lichid	Categoria 1	Categoria 1
Clorhexidină	55-56-1	Amină, amidină	Solid	Categoria 1	Categoria 1
Acid dibenzoil-L-tartric	2743-38-6	Acid carboxilic, ester	Solid	Categoria 1	Categoria 1
Imidazol	288-32-4	Heterociclu	Solid	Categoria 1	Categoria 1
Acid tricloracetic (30 %)	76-03-9	Acid carboxilic	Lichid	Categoria 1	Categoria 1
Clorura de 2,6-Diclorbenzoil	4659-45-4	Halogenură de acil	Lichid	Categoria 2A	Nu se poate efectua o estimare precisă/ fiabilă
Etil-2-metil-acetocetat	609-14-3	Cetonă, ester	Lichid	Categoria 2B	Nu se poate efectua o estimare precisă/ fiabilă
Nitrat de amoniu	6484-52-2	Sare anorganică	Solid	Categoria 2 ⁽³⁾	Nu se poate efectua o estimare precisă/ fiabilă
EDTA, sare dipotasică	25102-12-9	Amină, acid carboxilic (sare)	Solid	Neclasificat	Neclasificat
Tween 20	9005-64-5	Ester, polieter	Lichid	Neclasificat	Neclasificat

Substanță chimică	NR. CAS	Clasă chimică ⁽¹⁾	Forma fizică	Clasificare <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Clasificare BCOP
2-mercaptopirimi- dină	1450-85-7	Halogenură de acil	Solid	Neclasificat	Neclasificat
Fenilbutazonă	50-33-9	Heterociclu	Solid	Neclasificat	Neclasificat
Eter lauric de polio- xietilenă 23 (BRIJ- 35) (10 %)	9002-92-0	Alcool	Lichid	Neclasificat	Neclasificat

Abrevieri: Nr. CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service

⁽¹⁾ Clasele chimice sunt desemnate pentru fiecare substanță chimică de testat prin utilizarea unei scheme de clasificare standard, pe baza sistemului de clasificare National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (disponibil la <http://www.nlm.nih.gov/mesh>)

⁽²⁾ Pe baza rezultatelor furnizate de testul *in vivo* pe ochi de iepure (OCDE TG 405) și prin utilizarea GHS al ONU (4).

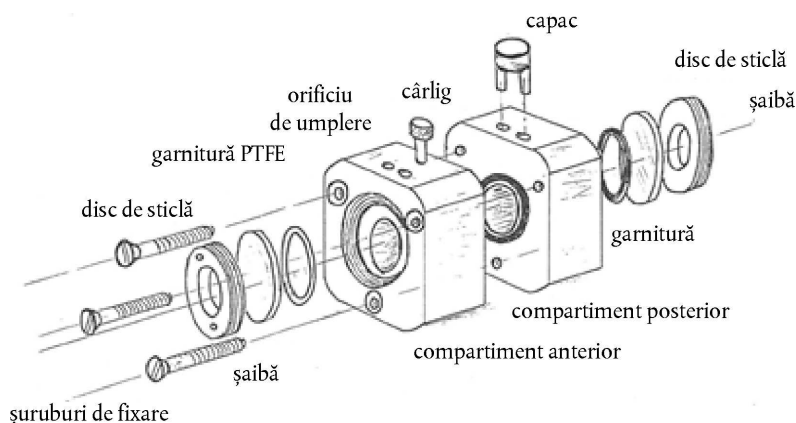
⁽³⁾ Clasificarea drept categoria 2A sau 2B depinde de interpretarea criteriului GHS al ONU de distincție între cele două categorii, și anume, 1 din 3 versus 2 din 3 animale, cu efecte din ziua 7, necesar pentru a se efectua o clasificare în categoria 2A. Studiu *in vivo* a inclus 3 animale. Toți parametri studiați, cu excepția roșeții conjunctivei la un singur animal, s-au recuperat la un punctaj de zero până în ziua 7 sau mai devreme. Singurul animal care nu s-a recuperat pe deplin în ziua 7a avut un punctaj de roșeață a conjunctivei de 1 (în ziua 7), care s-a recuperat în totalitate în termen de 10 zile.

Apendicele 4

SUPPORTUL CORNEAN BCOP

Suporturile corneene BCOP sunt confecționate dintr-un material inert (de exemplu, polipropilenă). Suporturile sunt formate din două jumătăți (o cameră anterioară și una posterioară) și au două camere cilindrice interne similare. Fiecare cameră are un volum de 5 ml și conține la capăt un geam din sticlă, prin care se observă și se înregistrează opacitatea. Camerele interne au un diametru de 1,7 cm și o adâncime de 2,2 cm ⁽¹⁾. Eventualele scurgeri sunt prevenite cu ajutorul unei garnituri amplasate în camera posterioară. Corneele se plasează cu partea endotelială pe garnitura camerei posterioare, iar camerele interioare se plasează pe partea epitelială a corneelor. Camerele sunt fixate cu trei șuruburi din oțel inoxidabil aflate pe muchiile exterioare ale camerei. La capătul fiecărei camere se află un geam de sticlă amovibil, care permite accesul facil la cornee. De asemenea, se plasează o garnitură între geamul de sticlă și cameră pentru prevenirea scurgerilor. Două orificii situate în partea superioară a fiecăreia dintre cele două camere permit introducerea și îndepărtarea mediului și a substanțelor chimice de testare. Aceste orificii sunt închise cu capace de cauciuc pe perioadele de tratament și de incubajie. Transmitia luminii prin suporturile corneene se poate schimba deoarece efectele uzurii fizice sau ale acumulării de reziduuri chimice specifice în orificiile camerei interioare sau pe geamul de sticlă pot afecta dispersia sau reflexia luminii. Drept consecință, transmitia luminii de bază ar putea înregistra creșteri sau scăderi (și în opoziție cu citirile de bază ale opacității) prin suportul corneean și ar putea fi evidențiate drept modificări semnificative ale măsurătorilor inițiale de bază preconizate pentru opacitatea corneeană în camerele individuale (și anume, valorile inițiale de opacitate corneeană în suporturi corneene individuale specifice pot diferi în mod obișnuit cu mai mult de 2 sau 3 unități de opacitate față de valorile de bază preconizate). Fiecare laborator trebuie să ia în considerare crearea unui program pentru evaluarea modificărilor transmisiei luminii prin suporturile corneene, în funcție de natura substanțelor chimice testate și frecvența utilizării camerelor. Pentru a stabili valorile de bază, suporturile corneene pot fi verificate înainte de utilizarea sistematică prin măsurarea nivelului de bază al valorilor opacității (sau ale transmisiei luminii) a camerelor umplute cu mediu complet, fără cornee. Suporturile corneene sunt verificate apoi periodic pentru a se ține cont de modificările aduse transmisiei luminii în timpul perioadelor de utilizare. Fiecare laborator poate stabili frecvența de verificare a suporturilor corneene, în funcție de substanțele chimice utilizate, frecvența de utilizare și observațiile modificărilor valorilor de bază ale opacității corneene. În cazul în care se observă modificări semnificative în transmitia luminii prin suporturile corneene, se ia în considerare efectuarea de proceduri corespunzătoare de curățare și/sau lustruire a suprafeței interioare a suporturilor corneene sau de înlocuire a acestora.

Suport cornean: diagramă descompusă



⁽¹⁾ Dimensiunile indicate se referă la un suport corneean utilizat pentru bovine a căror vârstă variază între 12 și 60 de luni. În cazul în care se utilizează animale cu vârsta cuprinsă între 6-12 luni, suportul trebuie să fie proiectat astfel încât volumul fiecărei camere să fie de 4 ml, iar fiecare dintre camerele interioare să aibă un diametru de 1,5 cm și o adâncime de 2,2 cm. Este foarte important ca raportul între suprafața zonei corneene expuse și volumul camerei posterioare a suporturilor corneene noi să fie identic cu raportul existent în cazul suportului corneean tradițional. Acest lucru este necesar pentru a asigura determinarea corectă a valorilor permeabilității, în scopul calculării IVIS prin formula propusă.

Apendicele 5

OPACIMETRUL

Opacimetrul este un dispozitiv de măsurare a transmisiei luminii. De exemplu, pentru echipamentele OP-KIT ale Electro Design (Riom, Franța) utilizate în procesul de validare a metodei de testare BCOP, lumina care provine de la o lampă cu halogen este trimisă printr-un compartiment de control (o cameră goală fără ferestre sau lichid) la o celulă fotoelectrică și comparată cu lumina trimisă prin compartimentul experimental, care adăpostește camera care conține corneea, către o celulă fotoelectrică. Diferențele în lumina transmisă către celulele fotoelectrice se compară și valoarea numerică a opacității se afișează pe un ecran digital. Se stabilesc unitățile de opacitate. Alte tipuri de opacimetre cu o structură diferită (de exemplu, care nu necesită măsurătorile paralele ale compartimentelor de control și de experiment) pot fi utilizate, dacă se dovedește că acestea oferă rezultate similare cu echipamente validate.

Opacimetrul trebuie să asigure un răspuns linear, aflat într-un interval de valori ale opacității corespunzătoare limitelor utilizate pentru diferitele clasificări prevăzute în modelul predictiv (și anume, până la limitele care provoacă coroziune/iritație severă). Pentru obținerea unor valori lineare și precise de până la 75-80 unități de opacitate, este necesară calibrarea opacimetrului cu ajutorul unor dispozitive etalon. Dispozitivele etalon sunt plasate în camera de calibrare (o cameră corneeană proiectată să conțină dispozitivele de calibrare) și se citesc valorile indicate de opacimetru. Camera de calibrare este proiectată astfel încât dispozitivele etalon să fie plasate la aproximativ aceeași distanță între sursa de lumină și celula fotoelectrică la care vor fi plasate corneele pe durata măsurării opacității. Valorile de referință și punctul de referință inițial depind de tipul de echipament utilizat. Linearitatea măsurătorilor de opacitate se asigură prin proceduri (specifice instrumentului) adecvate. De exemplu, pentru echipamentele OP-KIT ale Electro Design (Riom, Franța), opacimetrul este calibrat la 0 unități de opacitate, utilizând camera de calibrare fără niciun dispozitiv etalon. După aceasta, se plasează pe rând trei dispozitive etalon diferite în camera de calibrare și se măsoară opacitatea în fiecare caz. Dispozitivele etalon nr. 1, 2 și 3 trebuie să conducă la valori ale opacității egale cu valorile predeterminate de 75, 150 și, respectiv, 225 de unități de opacitate, cu o variație de $\pm 5\%$.

(13) În partea B, capitolul B.48 se înlocuiește cu următorul text:

„B.48 Metoda de testare a ochiului izolat de pui pentru identificarea i) substanțelor chimice care provoacă lezarea oculară gravă și a ii) substanțelor chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă

INTRODUCERE

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 438 (2013). Metoda de testare a ochiului izolat de pui (ICE) a fost evaluată de către Comitetul de coordonare la nivel de agenții privind validarea metodelor alternative (ICCVAM), în coroborare cu Centrul European pentru validarea metodelor alternative (ECVAM) și Centrul Japonez pentru validarea metodelor alternative (JaCVAM) în anul 2006 și 2010 (1) (2) (3). În cadrul primei evaluări, ICE a fost aprobată ca o metodă de testare valabilă din punct de vedere științific pentru a fi utilizată ca test pentru a identifica substanțele chimice (substanțe și amestecuri) care provoacă lezarea oculară gravă (categoria 1), astfel cum sunt definite în sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS) al Organizației Națiunilor Unite (ONU) (1) (2) (4) și Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ⁽¹⁾. În cadrul celei de a doua evaluări, metoda de testare ICE a fost evaluată în vederea utilizării ca test de screening pentru a identifica substanțele chimice neclasificate în ceea ce privește iritația oculară și lezarea oculară gravă, astfel cum sunt definite în GHS al ONU (3) (4). Rezultatele din studiul de validare și recomandările grupului de revizuire inter pares au menținut recomandarea inițială de utilizare a ICE pentru clasificarea substanțelor chimice care provoacă lezarea oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU), având în vedere faptul că baza de date disponibilă a rămas neschimbată de la validarea inițială a ICCVAM. În stadiul respectiv, nu au fost sugerate recomandări suplimentare pentru extinderea domeniului de aplicabilitate a ICE pentru a include, de asemenea, alte categorii. O reevaluare a setului de date *in vitro* și *in vivo* utilizat în studiul de validare a fost efectuată cu scopul de a evalua utilitatea ICE

⁽¹⁾ Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353, 31.12.2008, p. 1.

pentru identificarea substanțelor chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă (5). Reevaluarea a ajuns la concluzia că metoda de testare ICE poate fi utilizată, de asemenea, pentru a identifica substanțe chimice care nu necesită clasificare în ceea ce privește iritația oculară și lezarea oculară gravă, astfel cum sunt definite în GHS al ONU (4) (5). Această metodă de testare include utilizările și limitările recomandate ale metodei de testare ICE pe baza evaluărilor respective. Principalele diferențe între versiunea inițială din anul 2009 și versiunea actualizată din anul 2013 a orientării OCDE privind testarea includ, dar nu se limitează la utilizarea metodei de testare ICE la identificarea substanțelor chimice care nu necesită clasificare în conformitate cu GHS al ONU, o actualizare a elementelor raportului de testare, o actualizare a apendicelui 1 privind definițiile și o actualizare a apendicelui 2 privind substanțele chimice de verificare.

În prezent, este general acceptat faptul că în viitorul apropiat niciun test *in vitro* de iritație oculară nu va putea înlocui testul ocular *in vivo* Draize pentru a efectua estimări în cadrul întregii game de iritații pentru diferite clase de substanțe chimice. Cu toate acestea, combinații strategice de mai multe metode de testare alternative în cadrul unei strategii de testare (secvențiale) ar putea înlocui testul ocular Draize (6). Abordarea descendentă (7) este proiectată pentru a fi utilizată în cazul în care, pe baza informațiilor existente, se preconizează că o substanță chimică are potențial iritant ridicat, în timp ce abordarea ascendentă (7) este proiectată pentru a fi utilizată în cazul în care, pe baza informațiilor existente, se preconizează că o substanță chimică nu cauzează iritație oculară suficientă pentru a necesita o clasificare. Metoda de testare ICE este o metodă de testare *in vitro* care poate fi utilizată, în anumite cazuri și cu limite specifice, astfel cum sunt descrise la punctele 8-10, pentru clasificarea riscurilor la nivel ocular și etichetarea substanțelor chimice. Cu toate că nu este considerată validă ca metodă de testare de sine stătătoare de substituie a testului *in vivo* pe ochi de iepure, metoda de testare ICE este recomandată ca o etapă inițială în cadrul unei strategii de testare precum abordarea descendentă propusă de către Scott *et al.* (7) pentru a identifica substanțele chimice care provoacă lezarea oculară gravă, și anume, substanțele chimice care urmează să fie încadrate în categoria 1 din GHS al ONU fără testare suplimentară (4). Metoda de testare ICE este recomandată, de asemenea, pentru a identifica substanțele chimice care să nu necesită clasificare în ceea ce privește iritația oculară și lezarea oculară gravă, astfel cum sunt definite în GHS al ONU („nicio categorie”, NC) (4), și, prin urmare, poate fi utilizată ca o etapă inițială în cadrul unei strategii de testare ascendente (7). Cu toate acestea, o substanță chimică care nu se preconizează să cauzeze lezare oculară gravă sau care nu este clasificată pentru iritația oculară/lezare oculară gravă prin metoda de testare ICE ar necesita teste suplimentare (*in vitro* și/sau *in vivo*) pentru a se stabili o clasificare definitivă. În plus, este necesară consultarea autorităților de reglementare competente înainte de a utiliza ICE în cadrul unei abordări ascendente în conformitate cu alte scheme de clasificare decât cele GHS al ONU.

Scopul acestei metode de testare este de a descrie procedurile utilizate pentru a evalua potențialul riscurilor la nivel ocular al unei substanțe chimice de testat, măsurat prin capacitatea acesteia de a provoca sau nu toxicitate într-un ochi enucleat de pui. Efectele toxice la nivelul corneei sunt măsurate prin (i) o evaluare calitativă a opacității, (ii) o evaluare calitativă a leziunilor epitelului pe baza aplicării de fluoresceină în ochi (retenție de fluoresceină), (iii) o măsurare cantitativă a creșterii grosimii (inflamare) și (iv) o evaluare calitativă a leziunilor morfologice macroscopice ale suprafeței. Opacitatea corneeană, inflamarea și evaluările leziunilor după expunerea la o substanță chimică de testat se stabilesc în mod individual, apoi rezultatele se combină pentru a se obține o clasificare a iritației oculare.

Definițiile sunt prevăzute în apendicele 1.

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITĂRI

Această metodă de testare are la bază protocolul propus în documentul de orientare nr. 160 al OCDE (8), care a fost elaborat în urma studiului internațional de validare ICCVAM (1) (3) (9), cu contribuții din partea Centrului european pentru validarea metodelor alternative, a Centrului japonez pentru validarea metodelor alternative și a Departamentului TNO pentru calitatea vieții, toxicologie și farmacologie aplicată (Țările de Jos). Protocolul a fost întocmit pe baza informațiilor conținute în protocoalele publicate și în protocolul utilizat în prezent de către TNO (10) (11) (12) (13) (14).

O gamă largă de substanțe chimice a fost testată în cadrul procesului de validare care sta la baza acestei metode de testare, iar baza de date empirice a studiului de validare a cuprins 152 de substanțe chimice, incluzând 72 de substanțe chimice și 80 de amestecuri (5). Metoda de testare este aplicabilă substanțelor solide, lichide, emulsiilor și gelurilor. Substanțele lichide pot fi apoase sau neapoase; substanțele solide pot fi solubile sau insolubile în apă. Gazele și aerosolii nu au fost încă evaluați în cadrul unui studiu de validare.

Metoda de testare ICE poate fi utilizată pentru a identifica substanțele chimice care provoacă lezarea oculară gravă, și anume, substanțele chimice care urmează să fie clasificate în categoria 1 din GHS al ONU (4). Atunci când sunt utilizate în acest scop, limitele de aplicare identificate pentru metoda de testare ICE se bazează pe rata ridicată de rezultate fals pozitive pentru alcoolii și ratele ridicate de rezultate fals negative pentru substanțele solide și surfactanți (1) (3) (9). Cu toate acestea, în acest context (categoria 1 din GHS al ONU identificată ca nefiind categoria 1 din GHS al ONU), ratele de rezultate fals negative nu sunt critice având în vedere faptul că toate substanțele chimice care conduc la rezultate negative ar fi testate ulterior utilizând un test(e) *in vitro* validat(e) în mod corespunzător sau, ca ultimă opțiune, la iepuri, în funcție de cerințele de reglementare, utilizând o strategie de testare secvențială cu o abordare pe baza forței probante. Se remarcă faptul că substanțele solide pot conduce la condiții de expunere extreme și variabile în testul Draize de iritație oculară *in vivo*, care pot avea ca rezultat estimări irelevante în ceea ce privește potențialul lor iritant real (15). Inspectorii ar putea avea în vedere utilizarea acestei metode de testare pentru toate tipurile de substanțe chimice, prin care un rezultat pozitiv se acceptă drept indicator al lezării oculare grave, și anume încadrarea în categoria 1 din GHS al ONU fără testări suplimentare. Cu toate acestea, rezultatele pozitive obținute cu ajutorul alcoolilor se interpretează cu prudență, având în vedere riscul de producere a unor supraestimări.

Atunci când este utilizată pentru a identifica substanțele chimice care provoacă lezarea oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU), metoda de testare ICE are o precizie generală de 86 % (120/140), o rată de rezultate fals pozitive de 6 % (7/113) și o rată de rezultate fals negative de 48 % (13/27) în comparație cu datele privind metoda de testare *in vivo* pe ochi de iepure clasificate în conformitate cu sistemul de clasificare GHS al ONU (4) (5).

Metoda de testare ICE poate fi utilizată, de asemenea, pentru a identifica substanțele chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă în temeiul sistemului de clasificare GHS al ONU (4). Este necesară consultarea autorităților de reglementare competente înainte de a utiliza ICE în cadrul unei abordări ascendente în conformitate cu alte scheme de clasificare. Această metodă de testare poate fi utilizată pentru toate tipurile de substanțe chimice, prin care un rezultat negativ ar putea fi acceptat pentru neclasificarea unei substanțe chimice pentru iritația oculară și lezarea oculară gravă. Cu toate acestea, pe baza un singur rezultat din baza de date de validare, vopsele antivegetative organice care conțin solvent pot prezenta subestimări (5).

Atunci când este utilizată pentru a identifica substanțele chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară și lezarea oculară gravă, metoda de testare ICE are o precizie generală de 82 % (125/152), o rată de rezultate fals pozitive de 33 % (26/79) și o rată de rezultate fals negative de 1 % (1/73) în comparație cu datele privind metoda de testare *in vivo* pe ochi de iepure clasificate în conformitate cu sistemul de clasificare GHS al ONU (4) (5). În cazul în care substanțele chimice din cadrul anumitor categorii (și anume, vopsele antivegetative organice care conțin solvent) sunt eliminate din baza de date, precizia metodei de testare ICE este de 83 % (123/149), rata de rezultate fals pozitive este de 33 % (26/78), iar rata de rezultate fals negative este de 0 % (0/71) în ceea ce privește sistemul de clasificare GHS al ONU (4) (5).

Metoda de testare ICE nu este recomandată pentru identificarea substanțelor chimice de testat care sunt clasificate drept iritante la nivel ocular (și anume, categoria 2 sau categoria 2A din GHS al ONU) sau substanțele chimice de testat care sunt clasificate drept ușor iritante la nivel ocular (categoria 2B din GHS al ONU) având în vedere numărul considerabil de substanțe chimice din categoria 1 din GHS al ONU clasificate greșit drept categoria 2, 2A sau 2B din GHS al ONU și de substanțe chimice din categoria „nicio categorie” din UN GHS al ONU clasificate excesiv drept categoria 2, 2A sau 2B din GHS al ONU. În acest scop, ar putea fi necesare teste suplimentare utilizând o altă metodă adecvată.

Toate procedurile efectuate pe ochi de pui trebuie să respecte regulamentele și normele de manipulare a materialelor de origine umană sau animală, precum țesuturi și lichide tisulare, fără a se limita la acestea. Sunt recomandate măsurile de precauție universale aplicabile în laboratoare (16).

Cu toate că metoda de testare ICE nu ia în considerare leziunile conjunctivale și iridiane ca fiind evaluate în metoda de testare a iritării ochiului de iepure, acesta abordează efectele corneei, care sunt principalul motor de clasificare *in vivo* atunci când se ia în considerare clasificarea GHS al ONU. De asemenea, deși reversibilitatea leziunilor corneene nu poate fi evaluată în mod separat prin metoda de testare ICE, s-a propus, pe baza studiilor pe ochi de iepure, utilizarea unei evaluări a adâncimii inițiale a leziunii corneene pentru a identifica anumite tipuri de efecte ireversibile (17). În special, sunt necesare cunoștințe științifice suplimentare pentru a înțelege modul în care se produc efectele ireversibile care nu au legătură cu leziunea inițială de nivel ridicat. În sfârșit, metoda de testare ICE nu permite evaluarea toxicității sistemice potențiale asociate expunerii oculare.

Această metodă de testare va fi actualizată periodic, pe măsură ce se iau în considerare noi informații și date. De exemplu, histopatologia ar putea fi utilă atunci când este necesară o caracterizare mai cuprinzătoare a leziunilor corneene. Pentru a evalua această posibilitate, utilizatorii sunt încurajați să păstreze ochii și să pregătească exemplarele histopatologice care pot fi utilizate pentru a dezvolta o bază de date și criterii de decizie care pot îmbunătăți în continuare acuratețea acestei metode de testare. OCDE a elaborat un document de orientare privind utilizarea metodelor de testare *in vitro* a toxicității oculare care include proceduri detaliate privind colectarea de specimene histopatologice și informații cu privire la locul de prezentare a specimenelor și/sau a datelor cu privire la histopatologie (8).

Toate laboratoarele care utilizează pentru prima dată această testare trebuie să utilizeze substanțele chimice de verificare menționate în apendicele 2. Un laborator poate utiliza substanțele chimice respective pentru a-și demonstra competența tehnică în ceea ce privește aplicarea metodei de testare ICE înainte de a transmite datele analizei ICE în scopul clasificării reglementare a pericolelor.

PRINCIPIUL TESTULUI

Metoda de testare ICE este un model organotipic care permite menținerea pe termen scurt a ochiului de pui *in vitro*. În cadrul acestei metode de testare, leziunile provocate de substanța chimică de testat sunt evaluate în funcție de inflamarea corneană, opacitate și retenția de fluoresceină. În timp ce ultimii doi parametri presupun o evaluare calitativă, analiza inflamării corneene asigură o evaluare cantitativă. Fiecare măsurare este transformată într-un scor cantitativ utilizat pentru a se calcula un indice general de iritare sau primește un indice calitativ utilizat pentru a desemna o clasificare a riscurilor *in vitro* la nivel ocular, fie drept categoria 1 din GHS al ONU, fie drept neclasificat conform GHS al ONU. Oricare dintre cele două rezultate poate fi utilizat ulterior pentru a estima potențialul de lezare oculară *in vivo* sau nicio cerință pentru clasificarea riscurilor la nivel ocular prezentate de o substanță chimică de testat (a se vedea criteriile de decizie). Cu toate acestea, substanțele chimice pentru care nu se preconizează faptul că provoacă leziuni oculare grave sau care nu sunt clasificate prin metoda de testare ICE nu pot fi clasificate (a se vedea punctul 11).

Sursa și vârsta ochilor de pui

Până în prezent, pentru această evaluare au fost utilizați ochi colectați de la pui sacrificați în abatoare pentru consumul uman, nefiind necesare animale de laborator. Sunt utilizați exclusiv ochi proveniți de la animale considerate adecvate pentru consumul uman.

Cu toate că nu a fost efectuat un studiu controlat de evaluare a vârstei optime a puilor, vârsta și greutatea puilor utilizați până în prezent pentru această metodă de testare sunt cele ale puilor de primăvară procesați în mod normal de un abator (și anume, de aproximativ 7 săptămâni, 1,5– 2,5 kg).

Colectarea și transportul ochilor la laborator

Capetele se îndepărtează imediat după sedarea puilor, de regulă prin șoc electric și incizie la nivelul gâtului pentru scurgerea sângelui. Se recomandă identificarea unei ferme de pui aflate în apropierea laboratorului, astfel încât capetele să fie transferate de la abator către laborator într-un timp suficient de scurt pentru a reduce riscul de deteriorare și/sau contaminare bacteriană. Perioada de timp dintre colectarea capetelor și plasarea în camera de suprafuziune după enucleere trebuie să fie redusă la minim (în mod normal, în două ore) pentru a se asigura îndeplinirea criteriilor de acceptare ale testului. Toți ochii utilizați pentru testare trebuie să provin din același grup de ochi și să fie colectați în aceeași zi.

Deoarece ochii sunt disecați în laborator, capetele se transportă intacte de la abator, la temperatură ambiantă (de regulă între 18 °C și 25 °C), în cutii de plastic și se mențin umede cu prosoape înmuiate în soluție salină izotonică.

Criterii de selecție și numărul de ochi utilizați în metoda ICE

Se resping ochii care, după enucleare, prezintă un nivel de bază ridicat al colorării cu fluoresceină și anume, $> 0,5$) sau opacitate corneeană (și anume, $> 0,5$).

Fiecare grup de testare și martorul pozitiv testat în paralel este format din cel puțin trei ochi. Grupul martor negativ sau martorul solvent (în cazul în care se utilizează un solvent diferit de soluția salină) este constituit din cel puțin un ochi.

În cazul materialelor solide care conduc la un rezultat NC conform GHS, se recomandă o a doua determinare a trei ochi pentru a confirma sau a elimina rezultatele negative.

PROCEDURĂ

Pregătirea ochilor

Pleoapele sunt excizate cu atenție, astfel încât să nu se lezeze corneea. Integritatea corneeană este evaluată rapid cu ajutorul unei picături de soluție de fluoresceină sodică 2 % (g/v) aplicată pe suprafața corneeană timp de câteva secunde, care apoi se clătește cu soluție salină izotonică. Ochiul tratați cu fluoresceină sunt apoi examinați cu un microscop cu lampă cu fantă, urmărindu-se eventualele leziuni ale corneei (și anume, valori ale retenției de fluoresceină și opacității corneene $\leq 0,5$).

În cazul în care nu prezintă leziuni, ochiul este îndepărtat din orbită cu atenție, astfel încât corneea să nu fie lezată. Globul ocular este scos din orbită prin fixarea membranei nictitante cu ajutorul unui forceps chirurgical, apoi mușchii oculari se taie cu un foarfece îndoite, cu vârf bont. Este important să se evite lezarea corneei ca urmare a unei presări excesive (și anume, leziuni de compresie).

Atunci când ochiul este îndepărtat din orbită, se păstrează atașată o porțiune vizibilă a nervului optic. După îndepărtarea din orbită, ochiul este plasat pe o suprafață absorbantă, iar membrana nictitantă și alte țesuturi conjunctive sunt eliminate.

Ochiul enucleat este prins cu o clemă din oțel inoxidabil, cu corneea poziționată vertical. Cleva este introdusă ulterior într-o cameră a aparatului de suprafuziune (18). Cleva este introdusă în aparatul de suprafuziune astfel încât corneea să fie complet irigată cu soluție izotonică (3-4 picături pe minut sau 0,1-0,15 ml/min). Temperatura camerelor aparatului de suprafuziune se menține la $32 \pm 1,5$ °C. În apendicele 3 este prezentată o diagramă a aparatului tipic de suprafuziune și a clemelor pentru ochi, care pot achiziționate din comerț sau confecționate. Aparatul poate fi modificat pentru a respecta cerințele din anumite laboratoare (de exemplu, pentru un număr diferit de ochi).

După ce au fost introduși în aparatul de suprafuziune, ochii sunt examinați din nou cu un microscop oftalmologic pentru eventuale leziuni apărute în timpul procedurii de disecție. În acest moment, se măsoară de asemenea, grosimea corneei în vârful său, cu ajutorul dispozitivului de măsurare a adâncimii atașat microscopului cu lampă cu fantă. Se înlocuiesc ochii care prezintă: (i) un coeficient al retenției de fluoresceină $> 0,5$; (ii) opacitate corneeană $> 0,5$; sau (iii) orice semne suplimentare de leziuni. În cazul ochilor care nu sunt respinși pe baza acestor criterii, se exclud ochii cu o grosime a corneei care deviază cu peste 10 % de la valoarea medie a tuturor ochilor. Utilizatorii trebuie să cunoască faptul că microscopul cu lampă cu fantă pot produce rezultate diferite ale grosimii corneei dacă lărgimea fantei microscopului este diferită. Această lățime se stabilește la 0,095 mm.

După examinarea și acceptarea ochilor, aceștia sunt incubați timp de aproximativ 45-60 de minute pentru a fi echilibrați cu sistemul de testare înainte dozării. După perioada de echilibrare, se înregistrează o valoare de referință 0 a grosimii și opacității corneei, care va fi utilizată ca valoare de bază (și anume, momentul de timp egal cu 0). Cantitatea de fluoresceină determinată în momentul disecției este utilizată ca valoare de referință măsurată pentru acea caracteristică.

Aplicarea substanței chimice de testat

Imediat după măsurarea valorii de referință zero, ochiul (aflat în suportul său) este extras din aparatul de suprafuziune și plasat într-o poziție orizontală, iar substanța chimică de testat se aplică pe corneea.

De regulă, substanțele chimice de testat lichide se testează nediluate, dar pot fi diluate dacă se consideră necesar (de exemplu, în cadrul elaborării testelor). Solventul utilizat de preferință pentru substanțele chimice de testat diluate este serul fiziologic. Cu toate acestea, solvenți alternativi pot fi utilizați în condiții controlate, cu condiția ca adecvarea solvenților diferiți de serul fiziologic să fie demonstrată.

Substanțele chimice de testat lichide se aplică pe corneea astfel încât întreaga suprafață a acesteia să fie acoperită uniform cu substanța chimică de testat; volumul standard este de 0,03 ml.

Dacă este posibil, substanțele chimice de testat solide se macină cât mai fin posibil cu ajutorul unui mojar cu pistil sau al unui instrument de măcinat comparabil. Pulberea se aplică pe corneea astfel încât suprafața să fie acoperită uniform cu substanța chimică de testat; cantitatea standard este de 0,03 g.

Substanța chimică de testat (lichidă sau solidă) se aplică timp de 10 secunde, după care ochiul se clătește cu soluție salină izotonică (aproximativ 20 ml) la temperatura camerei. După aceasta, ochiul (în suportul său) este reintrodus în aparatul de suprafuziune, în poziția verticală inițială. Dacă este necesar, clătirea suplimentară poate fi utilizată după aplicarea de 10 secunde și la intervale de timp ulterioare (de exemplu, la descoperirea de reziduuri de substanță chimică de testat pe corneea). În general, cantitatea de soluție salină utilizată pentru clătire nu este critică, dar observarea aderenței substanței chimice la corneea este importantă.

Substanțele chimice martor

În fiecare experiment se introduc martori negativi testați în paralel sau martori solvent/vehicul și martori pozitivi.

Atunci când se testează substanțe lichide 100 % sau substanțe solide prin metoda de testare ICE, se utilizează ser fiziologic ca martor negativ pentru a se detecta modificări nespecifice ale sistemului de testare și a se preveni un efect iritant în urma condițiilor de testare.

Atunci când sunt testate substanțe lichide diluate, metoda de testare prevede un grup de martori solvent/vehicul testat în paralel pentru a se detecta modificările nespecifice ale sistemului de testare și a se preveni un efect iritant în urma condițiilor de testare. Conform punctului 31, se poate utiliza doar un solvent/vehicul care nu afectează în mod negativ sistemul de testare.

În fiecare experiment se introduce un martor pozitiv testat în paralel constând într-un iritant ocular pentru a verifica dacă se obține un răspuns adecvat. Având în vedere faptul că testul ICE este utilizat în această metodă de testare pentru a identifica corozivi sau iritanți severi, martorul pozitiv trebuie să fie o substanță chimică de referință care provoacă un răspuns sever în cadrul acestei metode de testare. Cu toate acestea, pentru a se asigura evaluarea variabilității răspunsului martorului pozitiv în timp, dimensiunea răspunsului sever nu trebuie să fie excesiv de mare. Este necesară generarea de suficiente date *in vitro* pentru martorul pozitiv, astfel încât să poată fi calculat un interval statistic acceptabil pentru acesta. În cazul în care nu sunt disponibile date adecvate precedente privind metoda de testare ICE pentru un anumit martor pozitiv, poate fi necesară efectuarea de studii pentru a furniza aceste informații.

Exemple de martori pozitivi pentru substanțele chimice de testat lichide sunt acidul acetic 10 % sau clorura de benzoniu 5 %, în timp ce exemple de martori pozitivi pentru substanțe chimice de testat solide sunt hidroxidul de sodiu sau imidazolul.

Substanțele chimice etalon sunt utile pentru evaluarea potențialului iritant la nivel ocular al substanțelor chimice necunoscute din cadrul unei anumite clase de substanțe sau de produse sau pentru evaluarea potențialului iritant relativ al unei substanțe iritante la nivel ocular într-un interval specific de reacții iritante.

Caracteristici măsurate

Corneele tratate sunt evaluate înainte tratamentului și la 30, 75, 120, 180 și 240 minute (± 5 minute) după spălarea post-tratament. Aceste momente de observare permit un număr adecvat de măsurători pe parcursul celor patru ore de tratament, lăsând un interval suficient între măsurători pentru efectuarea observațiilor necesare la nivelul tuturor ochilor.

Caracteristicile evaluate sunt opacitatea corneană, inflamarea, retenția de fluoresceină și efectele morfologice (de exemplu, corodarea sau detașarea epitelului). Cu excepția retenției de fluoresceină (determinată numai înainte de tratament și la 30 de minute după expunerea la substanța chimică de testat), toate caracteristicile se determină în fiecare dintre momentele de observare menționate mai sus.

Se recomandă realizarea de fotografii pentru documentarea opacității corneene, a retenției de fluoresceină, a efectelor morfologice și, dacă s-au efectuat, a studiilor histopatologice.

După examinarea finală la un interval de patru ore, utilizatorii sunt încurajați să păstreze ochii într-un fixator adecvat (de exemplu, formol neutru tamponat) pentru un potențial examen histopatologic [a se vedea punctul 14 și referința bibliografică (8) pentru detalii].

Inflamarea corneană se determină prin măsurarea grosimii corneene efectuată cu ajutorul unui pahimetru cornean, atașat unui microscop cu lampă cu fantă. Aceasta se exprimă sub formă procentuală și se calculează pe baza măsurătorilor grosimii corneene conform formulei următoare:

$$\left(\frac{\text{grosimea corneană la momentul} - \text{grosimea corneană la momentul} = 0}{\text{grosimea corneană la momentul} = 0} \right) \times 100$$

Valoarea procentuală medie a inflamării corneene pentru toți ochii testați se calculează pentru toate momentele de observare. Pe baza punctajului maxim mediu al inflamării corneene, obținut în oricare dintre momentele de observare, se furnizează apoi punctajul general al categoriei pentru fiecare substanță chimică de testat (a se vedea punctul 51).

Opacitatea corneană este evaluată prin utilizarea pentru înregistrare a suprafeței corneei care este cea mai opacifiată, astfel cum se arată în tabelul 1. Valoarea medie a opacității corneene pentru toți ochii testați se calculează pentru toate momentele de observare. Pe baza punctajului mediu maxim al opacității corneene obținut în oricare dintre momentele de observare, se furnizează apoi un punctaj general al categoriei pentru fiecare substanță chimică de testat (a se vedea punctul 51).

Tabelul 1.

Punctajele opacității corneene

Punctaj	Observații
0	Absența opacității
0,5	Opacitate redusă
1	Zone dispersate sau difuze; detaliile irisului sunt vizibile în mod clar
2	Zone translucide ușor sesizabile; detaliile irisului sunt ușor neclare
3	Opacitate corneană severă; nu sunt vizibile anumite detalii ale irisului; dimensiunea pupilei este foarte puțin sesizabilă
4	Opacitate corneană completă; iris invizibil

Retenția de fluoresceină este evaluată numai pentru momentul de observare după 30 de minute, astfel cum se arată în tabelul 2. Valoarea medie a retenției de fluoresceină pentru toți ochii testați se calculează în consecință pentru momentul de observare după 30 de minute și este utilizată pentru punctajul general al categoriei furnizat pentru fiecare substanță chimică de testat (a se vedea punctul 51).

Tabelul 2.

Punctajele de retenție de fluoresceină.

Punctaj	Observații
0	Absența retenției de fluoresceină
0,5	Colorare redusă a unor celule izolate
1	Colorare a unor celule izolate dispersate pe zona tratată a corneei
2	Colorare intensă focalizată sau confluentă a unor celule izolate
3	Zone confluențe întinse ale corneei care rețin fluoresceină

Efectele morfologice includ „corodarea” celulelor epiteliale corneene, „detașarea” epiteliului, „formarea de asperități” la nivelul suprafeței corneene și „aderarea” de cornee a substanței chimice de testat. Aceste rezultate pot varia în gravitate și se pot produce în mod simultan. Clasificarea rezultatelor este subiectivă în funcție de interpretarea formulată de cercetător.

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea datelor

Rezultatele pentru opacitatea corneană, inflamarea corneei și reținerea de fluoresceină se evaluează separat pentru a genera o clasă ICE pentru fiecare caracteristică. Clasele ICE pentru fiecare caracteristică sunt combinate ulterior pentru a genera o clasificare a iritației oculare pentru fiecare substanță chimică de testat.

Criterii de decizie

După evaluarea fiecărei caracteristici, se pot desemna clasele ICE în funcție de un interval predeterminat. Interpretarea inflamării corneene (tabelul 3), a opacității (tabelul 4) și a retenției de fluoresceină (tabelul 5) utilizând patru clase ICE se realizează în conformitate cu scalele prezentate mai jos. Este important să se remarce faptul că punctajele pentru inflamarea corneană prezentate în tabelul 3 sunt aplicabile numai în cazul în care grosimea se măsoară cu un microscop cu lampă cu fantă (de exemplu, Haag-Streit BP900) cu dispozitivul de măsurare a adâncimii nr. 1 și cu lărgimea fantei setată la 9½, respectiv egală cu 0,095 mm. Utilizatorii trebuie să aibă în vedere faptul că microscopul cu lampă cu fantă pot produce rezultate diferite ale grosimii corneei dacă lărgimea fantei microscopului este diferită.

Tabelul 3

Criteriile de clasificare a ICE pentru inflamarea corneeană.

Inflamarea corneană medie (%) (*)	Clasa ICE
De la 0 la 5	I
> 5 până la 12	II

Inflamarea corneană medie (%) (*)	Clasa ICE
> 12 până la 18 (> 75 min după tratament)	II
> 12 până la 18 ($\leq$ 75 min după tratament)	III
> 18 până la 26	III
> 26 până la 32 (> 75 min după tratament)	III
> 26 până la 32 ($\leq$ 75 min după tratament)	IV
> 32	IV
(*) Cel mai mare punctaj mediu observat în orice moment	

Tabelul 4

Criteriile de clasificare a ICE pentru opacitate.

Punctajul maxim mediu pentru opacitate (*)	Clasa ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV
(*) Punctaj mediu maxim observat în orice moment (pe baza punctajelor opacității astfel cum sunt definite în tabelul 1).	

Tabelul 5

Criteriile de clasificare a ICE pentru retenția de fluoresceină

Punctaj mediu al retenției de fluoresceină la 30 de minute post-tratament (*)	Clasa ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV
(*) Pe baza punctajelor astfel cum sunt definite în tabelul 2.	

Clasificarea *in vitro* pentru o substanță chimică de testat este evaluată prin interpretarea clasificării GHS care corespunde combinării categoriilor obținute pentru inflamarea corneană, opacitatea corneană și retenția de fluoresceină, astfel cum este descrisă în tabelul 6.

Tabelul 6

Clasificări generale *in vitro*

Clasificare GHS al ONU	Combinatii ale celor 3 caracteristici
Nicio categorie	3 × I 2 × I, 1 × II
Nu se poate estima	Alte combinații
Categoria 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Opacitatea corneană ≥ 3 la 30 min (pentru cel puțin 2 ochi) Opacitatea corneană = 4 în orice moment (pentru cel puțin 2 ochi) Detașarea severă a epiteliului (pentru cel puțin 1 ochi)

(*) Combinații a căror probabilitate de apariție este mai mică.

Criterii de acceptare a studiului

Un test este considerat acceptabil în cazul în care martorul negativ testat în paralel sau grupul martor solvent/vehicul și martorii pozitivi testați în paralel sunt identificați ca neclasificați conform GHS și, respectiv, categoria 1 a GHS.

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații, dacă acestea prezintă relevanță pentru desfășurarea studiului:

Substanță chimică de testat și substanțele chimice martor

- Denumire (denumiri) chimică(e), precum denumirea structurală utilizată de către Chemical Abstracts Service (CAS), urmată de alte denumiri, dacă se cunosc;
- Numărul de înregistrare (Registry Number – RN) CAS, dacă se cunoaște;
- Purity și compoziția substanțelor chimice de testat/martor (în procent(e) de greutate), în măsura în care informația respectivă este disponibilă;
- Proprietăți fizico-chimice precum starea fizică, pH-ul, stabilitatea, hidrosolubilitatea, utile pentru efectuarea studiului;
- Tratamentul substanțelor chimice de testat/martor înainte de efectuarea testului, după caz (de exemplu, încălzire, măcinare);
- Stabilitatea, dacă este cunoscută.

Informații referitoare la sponsor și la instalația de testare

- Numele și adresa sponsorului, ale instalației de testare și ale directorului de studiu;
- Identificarea sursei ochilor (de exemplu, unitatea unde au fost colectați);

Condițiile metodei de testare

- Descrierea sistemului de testare utilizat;

- Microscopul cu lampă cu fantă utilizat (de exemplu, modelul) și reglajele instrumentelor pentru microscopul cu lampă cu fantă utilizat;
- Trimitere la rezultate ale martorilor negativi și pozitivi testați anteriori, dacă este cazul, date anterioare care atestă intervale acceptabile pentru martorii etalon testați în paralel;
- Procedura utilizată pentru a asigura integritatea (și anume, precizia și fiabilitatea) metodei de testare în timp (de exemplu, testarea periodică a substanțelor chimice de verificare).

Colectarea și pregătirea ochilor

- Vârsta și greutatea animalului donator și, dacă sunt disponibile, caracteristicile specifice ale animalelor de la care au fost colectați ochii (de exemplu, sexul, șușă);
- Condițiile de depozitare și de transport ale ochilor (de exemplu, data și ora colectării ochilor, perioada de timp dintre colectarea capetelor și introducerea ochilor enucleați în camera de suprafuziune);
- Pregătirea și montarea ochilor, inclusiv specificații privind calitatea acestora, temperatura camerelor ochilor și criteriile de selecție pentru ochii utilizați pentru testare.

Procedura de testare

- Numărul de duplicate utilizate;
- Identitatea martorilor pozitivi și negativi utilizați (dacă este cazul, de asemenea, a solventului și a martorilor etalon);
- Doza de substanță chimică de testat, aplicarea și timpul de expunere;
- Momentele de observare (înainte și după tratament);
- Descrierea criteriilor de evaluare și de decizie utilizate;
- Descrierea criteriilor de acceptare a studiului utilizate;
- Descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare.

Rezultate

- Prezentarea în formă tabelară a punctajelor de inflamare corneană, opacitate și retenție de fluoresceină obținute pentru fiecare ochi și la fiecare dintre momentele de observație, inclusiv punctaje medii în fiecare moment de observare a tuturor ochilor testați;
- Punctajele medii maxime de inflamare corneană, opacitate și retenție de fluoresceină observate (de la orice moment), precum și clasa ICE corespunzătoare.
- Descrierea oricăror altor efecte observate;
- Clasificare GHS *in vitro* derivată;
- După caz, fotografii ale ochiului;

Discutarea rezultatelor

Concluzie

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report – *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponibil la: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm
- (2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Disponibil la: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>

- (3) ICCVAM (2010)- ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Status of *in vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 107553A. Disponibil la: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>
 - (4) United Nations (UN) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, UN New York and Geneva, 2011. Disponibil la: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html
 - (5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment no. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Paris.
 - (6) Capitolul B.5 din prezenta anexă, Iritație/coroziune oculară acută.
 - (7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. *Toxicology In Vitro* 24, 1-9.
 - (8) OECD (2011) Guidance Document on „The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants”. Series on Testing and Assessment no. 160, OECD, Paris.
 - (9) ICCVAM. (2006). Background review document: Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponibil la: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm
 - (10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.
 - (11) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13p. Disponibil la: <http://ecvam-dbalml.jrc.ec.europa.eu/>
 - (12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.
 - (13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34:291-296.
 - (14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.
 - (15) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicology in Vitro* 20,78-81.
 - (16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponibil la: [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>]
 - (17) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.
 - (18) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.-Toxicol.* 19, 471-480.
-

Apendicele 1

DEFINIȚII

Precizie: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele „relevanței” acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul „concordanță” pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare.

Substanță chimică etalon: O substanță chimică utilizată în calitate de standard pentru comparația cu o substanță chimică de testat. O substanță chimică etalon trebuie să aibă următoarele proprietăți: (i) sursă (surse) compatibilă(e) și sigură(e); (ii) asemănări structurale și funcționale cu clasa de substanțe chimice testată; (iii) caracteristici fizico-chimice cunoscute; (iv) date justificative privind efecte cunoscute și (v) influență cunoscută în intervalul de răspuns dorit.

Abordarea ascendentă: Abordare pe etape utilizată pentru o substanță chimică susceptibilă de a nu necesita clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă, care începe cu determinarea substanțelor chimice care nu necesită clasificare (rezultat negativ) din alte substanțe chimice (rezultat pozitiv).

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Corneea: Regiunea transparentă a părții anterioare a globului ocular care acoperă irisul și pupila și care permite luminii să pătrundă în interior.

Opacitate corneeană: Măsurarea gradului de opacitate a corneei după expunerea la o substanță chimică de testat. Opacitatea corneeană crescută este un indicator al leziunii corneene.

Inflamare corneeană: O măsurare obiectivă în testul ICE a gradului de dilatare a corneei după expunerea la o substanță chimică de testat. Se exprimă sub formă procentuală și se calculează pe baza măsurătorilor nivelului de bază al grosimii corneene (pre-doză) și ale grosimii înregistrate la intervale regulate după expunere la substanța chimică testată prin testul ICE. Gradul de inflamare corneeană este un indicator al leziunii corneene.

Iritație oculară: Producerea de modificări în ochi în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care sunt complet reversibile în termen de 21 de zile de la aplicare. Termen utilizat în paralel cu „efecte reversibile asupra ochilor” și cu „categoria 2 din GHS al ONU” (4).

Rată de rezultate fals negative: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind negative. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Rată de rezultate fals pozitive: Proporția tuturor substanțelor chimice negative identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind pozitive. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Retenție de fluoresceină: O măsurare subiectivă în cadrul testului ICE a gradului în care fluoresceina de sodiu este reținută de celulele epiteliale din corneea după expunerea la o substanță de testat. Gradul de retenție de fluoresceină este un indicator al leziunii la nivelul epiteliului corneean.

Pericol: Proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, un sistem sau o (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

Efecte ireversibile asupra ochilor: A se vedea „lezarea oculară gravă” și „categoria 1 din GHS al ONU”.

Amestec: Un amestec sau o soluție compusă din două sau mai multe substanțe, în care acestea nu intră în reacție (4).

Martor negativ: O probă replică netratată care conține toate componentele sistemului de testare. Această probă este analizată împreună cu probele tratate cu substanță chimică de testat și cu alte probe martor pentru a determina dacă solventul interacționează cu sistemul de testare.

Neclasificat: Substanțe care nu sunt clasificate pentru iritația oculară (categoria 2 din GHS al ONU) sau pentru lezarea oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU). Termen utilizat în paralel cu „nicio categorie” din GHS al ONU.

Martor pozitiv: O replică ce conține toate componentele unui sistem testat și care a fost tratată cu o substanță chimică cunoscută pentru faptul că provoacă o reacție pozitivă. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu trebuie să fie excesiv de mare.

Fiabilitate: Măsura în care o metodă de testare poate fi reprodusă în timp, în același laborator sau în laboratoare diferite, folosind același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau inter-laboratoare.

Efecte reversibile asupra ochilor: A se vedea „iritația oculară” și „categoria 2 din GHS al ONU”.

Lezarea oculară gravă: Producerea de leziuni tisulare la nivel ocular sau deteriorarea fizică gravă a vederii în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care nu sunt complet reversibile într-un interval de 21 de zile de la aplicare. Termen utilizat în paralel cu „efecte ireversibile asupra ochilor” și cu „categoria 1 din GHS al ONU” (4).

Microscop cu lampă cu fantă: Instrument utilizat pentru a examina direct ochiul, sub puterea de mărire a unui microscop binocular, prin crearea unei imagini stereoscopice, drepte. În cazul metodei de testare ICE, acest instrument este utilizat pentru a vizualiza structurile anterioare ale ochiului de pui și pentru a măsura în mod obiectiv grosimea corneană cu ajutorul unui dispozitiv de măsurare a grosimii atașat.

Martor solvent/vehicul: O probă netratată care conține toate componentele unui sistem testat, inclusiv solventul sau vehiculul analizat împreună cu eșantioanele de substanță chimică de testat tratate și cu alte probe martor pentru a stabili reacția de bază pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată în același solvent sau vehicul. Atunci când este testată în paralel cu un martor negativ, această probă indică, de asemenea, dacă solventul sau vehiculul interacționează cu sistemul testat.

Substanță: Elemente chimice și compuși lor în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a menține stabilitatea produsului și orice impuritate rezultată din procesul utilizat, dar cu excepția oricărui solvent care poate fi separat fără a influența stabilitatea substanței sau fără a schimba compoziția acesteia (4).

Surfactant: Denumit, de asemenea, agent cu activitate de suprafață, acesta este o substanță, cum ar fi un detergent, care poate reduce tensiunea superficială a unui lichid și, prin urmare, permite producerea spumei sau pătrunderea substanțelor solide; este cunoscut, de asemenea, ca agent tensioactiv.

Abordare descendentă: Abordare pe etape utilizată pentru o substanță chimică susceptibilă de a provoca lezarea oculară gravă, care începe cu determinarea substanțelor chimice care provoacă lezarea oculară gravă (rezultat pozitiv) din alte substanțe chimice (rezultat negativ).

Substanță chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare.

Strategie de testare secvențială: O strategie de testare pe etape în care toate informațiile existente cu privire la o substanță chimică de testat sunt revizuite, într-o anumită ordine, utilizând un proces al forței probante în fiecare etapă pentru a determina dacă sunt disponibile suficiente informații pentru o decizie privind clasificarea pericolelor înainte de a trece la etapa următoare. În cazul în care potențialul iritant al unei substanțe chimice de testat poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, nu este necesară o testare suplimentară. În cazul în care potențialul iritant al unei substanțe chimice de testat nu poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, o procedură de testare secvențială pe animale se efectuează până în momentul în care se poate efectua o clasificare lipsită de echivoc.

Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pericole pentru sănătate și pericole pentru mediu și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, de exemplu pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de siguranță, pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului (4).

Categoria 1 din GHS al ONU: a se vedea „lezarea oculară gravă” și/sau „efecte ireversibile asupra ochilor”.

Categoria 2 din GHS al ONU: a se vedea „iritația oculară” și/sau „Efecte reversibile asupra ochilor”.

„Nicio categorie” din GHS a ONU: Substanțe chimice care nu îndeplinesc cerințele pentru clasificare corespunzătoare categoriei 1 sau 2 (2A sau 2B) din GHS al ONU. Termen utilizat în paralel cu „neclasificat”.

Metodă de testare validată: Metodă de testare pentru care au fost completate studii de validare pentru a determina relevanța (inclusiv precizia) și fiabilitatea pentru un anumit scop. Este important de semnalat că este posibil ca performanțele unei metode de testare validate să nu fie suficiente din punct de vedere al preciziei și al fiabilității încât aceasta să fie considerată acceptabilă pentru scopul propus.

Forța probantă: Procesul prin care se iau în considerare punctele tari și punctele slabe ale unor informații diverse pentru a se formula și a se susține o concluzie în ceea ce privește potențialul pericolelor unei substanțe chimice de testat.

Apendicele 2

SUBSTANȚE CHIMICE DE VERIFICARE PENTRU METODA DE TESTARE ICE

Înainte de utilizarea sistematică a unei metode de testare conforme cu prezenta metodă de testare, laboratoarele trebuie să demonstreze performanțele tehnice proprii prin identificarea corectă a clasificării pericolelor la nivelul celor 13 substanțe chimice recomandate în tabelul 1. Substanțele respective au fost selectate pentru a reprezenta intervalul de reacții pentru pericolele la nivel ocular pe baza rezultatelor furnizate de testul *in vivo* pe ochi de iepure (TG 405) și sistemul de clasificare GHS al ONU (și anume, categoriile 1, 2A, 2B sau „nicio categorie”) (4) (6). Alte criterii de selecție au fost disponibilitatea comercială a substanțelor chimice, existența datelor de referință *in vivo* de calitate superioară și existența datelor de calitate superioară furnizate de metoda de testare *in vitro* ICE. Informațiile de referință sunt disponibile în registrul SSD (3) și în documentele ICCVAM de trecere în revistă a cadrului general pentru metoda de testare ICE (9).

Tabelul 1

Substanțe chimice recomandate pentru a demonstra performanțele tehnice prin metoda ICE

Substanță chimică	NR: CAS	Clasă chimică ⁽¹⁾	Forma fizică	Clasificare <i>In Vivo</i> ⁽²⁾	Clasificare <i>In Vitro</i> ⁽³⁾
Clorură de benzalconiu (5 %)	8001-54-5	Compus de tip onium	Lichid	Categoria 1	Categoria 1
Clorhexidină	55-56-1	Amină, amidină	Solid	Categoria 1	Categoria 1
Acid dibenzoil-L-tartric	2743-38-6	Acid carboxilic, ester	Solid	Categoria 1	Categoria 1
Imidazol	288-32-4	Heterociclu	Solid	Categoria 1	Categoria 1
Acid tricloracetic (30 %)	76-03-9	Acid carboxilic	Lichid	Categoria 1	Categoria 1
Clorură de 2,6-diclorbenzoil	4659-45-4	Halogenură de acil	Lichid	Categoria 2A	Nu se poate estima ⁽⁴⁾
Nitrat de amoniu	6484-52-2	Sare anorganică	Solid	Categoria 2A ⁽⁵⁾	Nu se poate estima ⁽⁴⁾
Etil-2-metil-acetocetate	609-14-3	Cetonă, ester	Lichid	Categoria 2B	Nu se poate estima ⁽⁴⁾
Dimetil sulfoxid	67-68-5	Compuși organici cu sulf	Lichid	Nicio categorie	Nicio categorie
Glicerină	56-81-5	Alcool	Lichid	Nicio categorie	Nicio categorie (limită)

Substanță chimică	NR: CAS	Clasă chimică ⁽¹⁾	Forma fizică	Clasificare <i>In Vivo</i> ⁽²⁾	Clasificare <i>In Vitro</i> ⁽³⁾
Metilciclopentan	96-37-7	Hidrocarburi (ciclice)	Lichid	Nicio categorie	Nicio categorie
N-hexan	110-54-3	Hidrocarbură (aciclică)	Lichid	Nicio categorie	Nicio categorie
Triacetină	102-76-1	Lipide	Lichid	Neclasificat	Nicio categorie

Abrevieri: NR: CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service.

⁽¹⁾ Clasele chimice au fost desemnate pentru fiecare substanță chimică de testat prin utilizarea unei scheme de clasificare standard, pe baza sistemului de clasificare al National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (disponibil la <http://www.nlm.nih.gov/mesh>)

⁽²⁾ Pe baza rezultatelor furnizate de testul *in vivo* pe ochi de iepure (OCDE TG 405) și prin utilizarea GHS al ONU (4) (6).

⁽³⁾ Pe baza rezultatelor obținute prin metoda ICE, astfel cum este descris în tabelul 6.

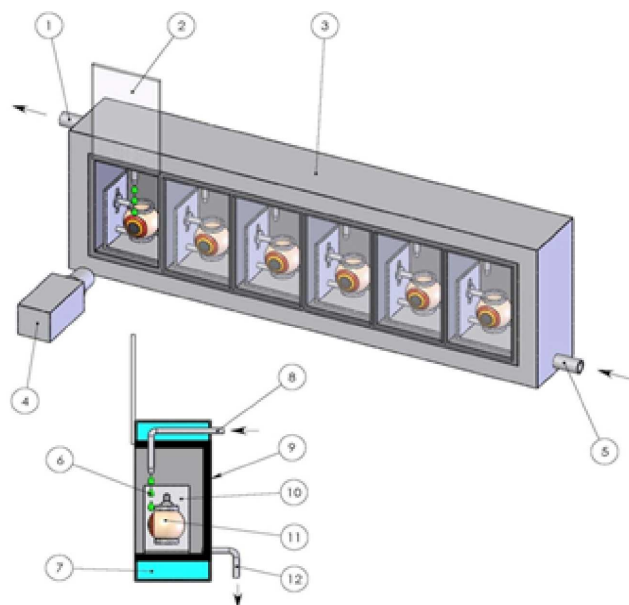
⁽⁴⁾ Combinații ale punctajelor metodei ICE, altele decât cele descrise în tabelul 6 pentru identificarea categoriei „nicio categorie” din GHS al ONU și categoria 1 din GHS al ONU (a se vedea tabelul 6).

⁽⁵⁾ Clasificarea în categoria 2A sau 2B depinde de interpretarea criteriului GHS al ONU de distincție între cele două categorii, și anume, 1 din 3 versus 2 din 3 animale, cu efecte din ziua 7, necesar pentru a se efectua o clasificare în categoria 2A. Studiu *in vivo* a inclus 3 de animale. Toți parametri studiați, cu excepția roșeții conjunctivei la un singur animal, s-au recuperat la un punctaj de zero până în ziua 7 sau mai devreme. Singurul animal care nu s-a recuperat pe deplin în ziua 7 a avut un punctaj de roșeață a conjunctivei de 1 (în ziua 7), care s-a recuperat în totalitate în termen de 10 de zile.

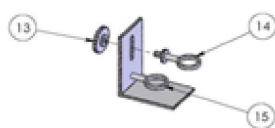
Apendicele 3

DIAGrame ALE APARATULUI DE SUPRAFUZIUNE ICE ȘI ALE CLEMELOR PENTRU OCHI

[A se vedea Burton et al. (18) pentru descrieri generice suplimentare ale aparatului de suprafuziune și ale clemelor pentru ochi]



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Nr. crt.	Descriere	Nr. crt.	Descriere
1	Evacuare apă caldă	9	Compartiment
2	Ușă glisantă	10	Suport ochi
3	Aparat de suprafuziune	11	Ochi de pui
4	Instrument de măsurare optică	12	Evacuare soluție salină
5	Admisie apă caldă	13	Șurub fixare
6	Soluții salină	14	Braț superior ajustabil
7	Apă caldă	15	Braț inferior fix
8	Admisie soluție salină		

(14) În partea B, capitolul B.49 se înlocuiește cu următorul text:

„B.49 Testul *in vitro* de micronucleu pe celule de mamifere

INTRODUCERE

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea nr. 487 (2016). Aceasta face parte dintr-o serie de metode de testare privind toxicologia genetică. A fost elaborat un document al OCDE care oferă informații succinte privind testarea pentru toxicologia genetică (1) și care trece în revistă modificările efectuate recent asupra orientărilor respective.

Testul *in vitro* de micronucleu (MNvit) este un test de genotoxicitate pentru identificarea micronucleelor (MN) în citoplasma celulelor în interfază. Micronucleele pot avea ca origine fragmente de cromozomi acentrici (și anume, fără centrometru) sau cromozomi integrali incapabili să migreze către polii celulei în timpul etapei de anafază a diviziunii celulare. Prin urmare, testul MNvit este o metodă *in vitro* care constituie un instrument de bază complet pentru investigarea potențialului de leziuni cromozomiale *in vitro* datorită capacității acestuia de evidențiere a agenților aneugenici și clastogeni (2) (3) în celulele care au efectuat diviziune celulară în timpul sau după expunerea la substanța chimică de testat (a se vedea punctul 13 pentru mai multe detalii). Micronucleele reprezintă leziunile transmise celulelor fiice, în timp ce aberațiile cromozomiale observate în celulele aflate în metafază pot să nu fie transmise. În ambele cazuri, modificările pot să nu fie compatibile cu supraviețuirea celulelor.

Această metodă de testare permite utilizarea de protocoale incluzând sau nu citocalasină B (citoB), inhibitorul de polimerizare a actinei. Adăugarea de citoB anterior mitozei are ca rezultat celule care sunt binucleate și, prin urmare, permite identificarea și analiza micronucleelor doar în acele celule care au încheiat procesul de mitoză (4) (5). Această metodă de testare permite, de asemenea, utilizarea de protocoale fără blocarea citocinezei, cu condiția existenței posibilității de a demonstra faptul că populația celulară analizată a efectuat mitoză.

În plus față de utilizarea testului MNvit pentru a identifica substanțele chimice care induc micronuclee, utilizarea marcării imunochimice a kinetocorilor sau hibridizarea cu sonde centrometrice/telomerice (hibridizarea *in situ* cu fluorescență (FISH) poate, de asemenea, să furnizeze informații suplimentare cu privire la mecanismele care stau la originea leziunilor cromozomiale și ale formării micronucleelor (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Procedurile de marcăre și de hibridizare menționate pot fi utilizate atunci când se constată o creștere a formării de micronuclee, iar cercetătorul dorește să stabilească dacă respectiva creștere este rezultatul unor evenimente clastogenice și/sau aneugene.

Deoarece micronucleele prezente în celulele în interfază pot fi evaluate în mod relativ obiectiv, personalul laboratorului trebuie doar să determine numărul de celule binucleate atunci când se utilizează citoB și incidența celulelor micronucleate în toate cazurile. Prin urmare, lamele pot fi examinate relativ rapid, iar analiza poate fi automatizată. Acest lucru permite examinarea a mii în loc de sute de celule pentru fiecare tratament, mărinde astfel puterea testului. În sfârșit, având în vedere faptul că micronucleele pot să provină de la cromozomi întârziați, există posibilitatea detectării agenților care induc aneuploidie care sunt dificil de studiat în cadrul testelor de aberații cromozomiale clasice, de exemplu, capitolul B.10 din prezenta anexă (18). Cu toate acestea, testul MNvit astfel cum este descris în prezenta metodă de testare nu permite diferențierea între substanțe chimice care provoacă modificări în numărul de cromozomi și/sau ploidie și substanțele care provoacă clastogenicitate fără utilizarea de tehnici speciale precum metoda FISH menționată la punctul 4.

Testul MNvit este fiabil și poate fi efectuat pe o diversitate de tipuri de celule, în prezența sau absența citoB. Validitatea testului MNvit este atestată de numeroase date obținute utilizând diferite tipuri de celule (culturi de linii celulare sau culturi de celule primare) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Acestea includ, în special, studii internaționale de validare coordonate de Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23) și rapoartele elaborate de International Workshop on Genotoxicity Testing (5) (17). De asemenea, datele disponibile au făcut obiectul unei noi evaluări în cadrul unui studiu de validare retrospectiv fondat pe forța probantă, efectuat de Centrul European pentru validarea metodelor alternative (ECVAM) al Comisiei Europene, iar metoda de testare a fost declarată valabilă din punct de vedere științific de către Comitetul științific consultativ al ECVAM (ESAC) (37) (38) (39).

Testul MNvit pe celule de mamifere poate să utilizeze culturi de linii celulare sau culturi de celule primare, de origine umană sau de la rozătoare. Deoarece frecvența de fond a micronucleelor va influența sensibilitatea testului, se recomandă utilizarea unor tipuri de celule cu o frecvență de fond stabilă și definită de formare de micronucleu. Celulele utilizate se selectează în funcție de capacitatea acestora de a se dezvolta în mod optim în cultură, de stabilitatea cariotipului acestora (inclusiv numărul de cromozomi) și frecvența spontană a micronucleelor (40). În prezent, datele disponibile nu permit efectuarea de recomandări ferme, dar sugerează faptul că este important, atunci când se evaluează pericolele chimice, să se ia în considerare statutul p53, stabilitatea genetică (a cariotipului), capacitatea de regenerare a ADN-ului și originea (rozătoare *versus* celule umane) celulelor alese pentru testare. Utilizatorii acestei metode de testare sunt încurajați, prin urmare, să ia în considerare influența acestor și altor caracteristici ale celulelor privind detectarea unei linii celulare a inducției de micronuclee, având în vedere faptul că cunoștințele evoluează în acest domeniu.

Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITĂRI

Testele efectuate *in vitro* necesită, în general, utilizarea unei surse exogene de activare metabolică, cu excepția cazului în care celulele sunt competente din punct de vedere metabolic cu substanțele chimice de testat. Sistemul exogen de activare metabolică nu reproduce integral condițiile *in vivo*. Se acordă atenție deosebită evitării condițiilor care ar conduce la rezultate pozitive date de artefacte care nu reflectă genotoxicitatea substanțelor chimice de testat. Aceste condiții includ modificările de pH (41) (42) (43) sau osmolalitate, interacțiunea cu mediul culturii de celule (44) (45) sau niveluri excesive ale citotoxicității (a se vedea punctul 29).

Pentru a analiza inducția micronucleelor, este esențial ca mitoză să se fi produs atât în culturile tratate, cât și în cele netratate. Cea mai prolifică etapă în materie de date în ceea ce privește examinarea micronucleelor este în celulele care au încheiat o mitoză în timpul sau ulterior tratamentului cu substanța chimică de testat. Pentru nanomaterialele fabricate, sunt necesare adaptări specifice ale acestei metode de testare, dar acestea nu sunt descrise în prezenta metodă de testare.

Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare specific, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare în cazul în care există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

PRINCIPIUL TESTULUI

Culturi de celule umane sau de altă origine mamiferă sunt expuse la substanța chimică de testat în prezența și în absența unei surse exogene de activare metabolică, cu excepția cazului în care sunt utilizate celule cu capacitate metabolică adecvată (a se vedea punctul 19).

În timpul și după expunerea la substanța chimică de testat, celulele se cultivă pentru o perioadă suficientă pentru a permite leziunii cromozomiale sau altor efecte asupra ciclului celular/diviziunii celulare să conducă la formarea de micronuclei în celule în interfază. Pentru inducția aneuploidiei, substanța chimică de testat trebuie în general să fie prezentă în timpul mitozei. Celulele recoltate și colorate în interfază sunt analizate pentru a detecta prezența micronucleelor. În mod ideal, examinarea micronucleelor se realizează în acele celule care au efectuat o mitoză completă în timpul expunerii la substanța chimică de testat sau în timpul perioadei post-tratament, dacă aceasta este prevăzută în cadrul metodei. În culturile care au fost tratate cu un agent de blocare a citocinezei, acest lucru este ușor de realizat prin examinarea doar a celulelor binucleate. În absența unui agent de blocare a citocinezei, este important să se demonstreze că celulele analizate au efectuat cel mai probabil diviziunea celulară, pe baza unei creșteri a populației de celule, în timpul sau după expunerea la substanța chimică de testat. Pentru toate protocoalele, este important să se demonstreze că proliferarea celulară a avut loc atât în culturile tratate, cât și în cele martor, iar gradul de citotoxicitate sau citostază indus de substanța chimică de testat este evaluat pentru toate culturile în care se realizează examinarea micronucleelor.

DESCRIEREA METODEI

Celule

În cadrul testului pot fi utilizate limfocite primare din sânge periferic uman sau de la alte mamifere în cultură (7) (20) (46) (47) și mai multe linii celulare provenite de la rozătoare precum CHO, V79, CHL/IU și celule L5178Y sau linii celulare umane, precum TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (a se vedea punctul 6). Alte linii celulare, cum ar fi HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), celule HepG2 (52), A549 (53) și celule embrionare primare de hamster sirian (54) au fost utilizate pentru testarea de micronucleu, dar până la acest moment nu au fost validate în mod extensiv. Prin urmare, utilizarea liniei și tipurilor de celule respective trebuie justificată pe baza performanței demonstrate în cadrul testului, astfel cum este descrisă în secțiunea referitoare la criteriile de acceptabilitate. CitoB a fost raportată ca având un potențial impact asupra creșterii celulelor L5178Y și, prin urmare, nu este recomandată cu această linie de celule (23). În cazul în care se utilizează celule primare, din motive de bunăstare a animalelor, se ia în considerare utilizarea de celule de origine umană atunci când este fezabil și de la care s-au prelevat probe în conformitate cu principiile și reglementările eticii umane.

Limfocitele din sângele periferic uman se obțin de la indivizi tineri (aproximativ 18-35 de ani), nefumători, fără vreo boală cunoscută sau expuneri recente la agenți genotoxici (de exemplu, substanțe chimice, radiații ionizante) la niveluri care ar conduce la creșterea incidenței generale a celulelor micronucleate. Acest lucru ar asigura ca incidența generală a celulelor micronucleate să fie scăzută și consistentă. Incidența de bază a celulelor micronucleate crește odată cu vârsta, iar această tendință este mai marcantă la femei decât la bărbați (55). În cazul în care celulele provenite de la mai mulți donatori sunt reunite pentru utilizare, se precizează numărul de donatori. Este necesar să se demonstreze că celulele s-au divizat de la începutul tratării cu substanța chimică de testat în celule prelevate. Culturile de celule sunt menținute în faza de creștere exponențială (linii celulare) sau sunt stimulate să se dividă (culturi primare de limfocite) pentru a expune celulele în diferite etape ale ciclului celular, având în vedere faptul că sensibilitatea etapelor celulare la substanțele chimice de testat poate să nu fie cunoscută. Celulele primare care necesită stimulare cu agenți mitogenici pentru a se divide nu mai sunt sincronizate, în general, în timpul expunerii la substanța chimică de testat (de exemplu, limfocite umane după o expunere mitogenică de 48 de ore). Utilizarea de celule sincronizate în timpul tratamentului cu substanța chimică de testat nu este recomandată, dar poate fi acceptabilă dacă este justificată.

Medii și condiții de cultură

Se recomandă utilizarea mediilor de cultură și a condițiilor de incubație (vasele de cultură, umiditate atmosferică de 5 % CO₂, după caz, temperatura de incubație de 37 °C) corespunzătoare pentru a menține culturile. Liniile celulare se verifică în mod regulat pentru stabilitatea numărului modal de cromozomi și absența contaminării cu *micoplasmă* și în cazul în care celulele au fost contaminate sau în cazul în care numărul modal de cromozomi s-a schimbat, acestea nu se utilizează. Se stabilește durata normală a ciclului celular al liniilor celulare sau al culturilor primare utilizate în laboratorul de testare, iar aceasta trebuie să fie conformă cu caracteristicile celulare publicate.

Pregătirea culturilor

Linii celulare: celulele se prepară plecând de la culturile de rezervă, se însămânțează în mediul de cultură la o anumită densitate astfel încât celulele în suspensie ori în culturile monostrat să continue să crească exponențial până la recoltarea acestora (de exemplu, se evită confluența celulelor care cresc în monostrat).

Limfocite: sângele integral tratat cu un anticoagulant (de exemplu, heparină) sau limfocite separate sunt plasate în cultură (de exemplu, de 48 de ore pentru limfocitele umane) în prezența unui mitogen [de exemplu fitohemaglutinină (PHA) pentru limfocitele umane] pentru a induce diviziune celulară anterior expunerii la substanța chimică de testat sau la citoB.

Activare metabolică

Recurgerea la un sistem de activare metabolică exogen este necesară în cazul utilizării de celule dotate cu o capacitate metabolică endogenă inadecvată. Sistemul utilizat cel mai frecvent, recomandat implicit, cu excepția cazului în care se justifică altfel, este o fracție postmitocondrială îmbogățită cu un cofactor (S9) preparată din ficat provenit de la rozătoare (în general, șobolani) tratat cu agenți de inducție enzimatică precum Aroclor 1254 (56) (57) sau un amestec de fenobarbital și b-naftoflavonă (58) (59) (60). Utilizarea celui din urmă amestec nu este contrară prevederilor Convenției de la Stockholm privind poluanții organici persistenți (61) și s-a dovedit a fi la fel de eficientă ca Aroclor 1254 pentru inducția de oxidaze cu funcție mixtă (58) (59) (60). Frația S9 este utilizată în general cu o concentrație cuprinsă între 1-2 % (v/v), dar poate fi majorată la 10 % (v/v) în mediul de testare final. Utilizarea de produse care reduc indicele mitotic, în special produsele de complexare cu calciu (62), se evită în timpul tratamentului. Alegerea tipului și concentrației sistemului exogen de activare metabolică sau inductorului metabolic utilizat poate fi influențată de clasa de substanțe chimice testată.

Prepararea substanței chimice de testat

Substanțele chimice de testat în stare solidă se pregătesc în solvenți adecvați și se diluează, dacă este cazul, anterior tratamentului aplicat celulelor. Substanțele chimice de testat în stare lichidă pot fi adăugate direct în sistemul de testare și/sau diluate anterior tratamentului sistemului de testare. Substanțele chimice de testat în stare gazoasă sau cele volatile se testează prin modificare adecvată a protocoalelor standard, de exemplu utilizarea de recipiente închise ermetic (63) (64) (65). Pregătirea de preparate de substanța chimică de testat se efectuează anterior tratamentului, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora în condiții de stocare.

Condiții de testare

Solvenți

Solventul se alege astfel încât să optimizeze solubilitatea substanței chimice de testat fără să afecteze desfășurarea testului, și anume, să modifice creșterea celulară, să afecteze integritatea substanței chimice de testat, să reacționeze cu vasele de cultură, să afecteze sistemul de activare metabolică. Se recomandă ca, în măsura în care este posibil, să se ia în considerare în primă instanță utilizarea unui solvent apos (sau un mediu de cultură). Solvenții bine stabiliți sunt apa sau dimetilsulfoxidul (DMSO). În general, solvenții organici nu trebuie să depășească 1 % (v/v). În cazul în care citoB se dizolvă în DMSO, cantitatea totală de solvent organic utilizat atât pentru substanța chimică de testat, cât și pentru citoB nu trebuie să depășească 1 % (v/v); în caz contrar, se utilizează martori netratați pentru a asigura ca procentajul de solvent organic nu are efecte adverse. Solvenții apoși (soluție salină sau apă) nu trebuie să depășească 10 % (v/v) în mediul de tratament final. În cazul în care nu se utilizează solvenți bine stabiliți (de exemplu, etanol sau acetonă), utilizarea acestora se justifică prin date care să indice compatibilitatea acestora cu substanța chimică de testat, cu sistemul de testare, precum și absența genotoxicității la concentrația utilizată. În lipsa acestor date justificative, este important să se includă martori netratați (a se vedea apendicele 1), precum și martori solvenți pentru a demonstra că solventul ales nu induce efecte vătămătoare sau cromozomiale (de exemplu, aneuploidie sau clastogenicitate).

Utilizarea de citoB ca agent de blocare a citocinezei

Unul dintre cele mai importante aspecte în efectuarea testului MNvit este garantarea faptului că celulele examinate au încheiat procesul de mitoză în timpul tratamentului sau în timpul perioadei de incubație post-tratament, dacă aceasta este prevăzută în cadrul metodei. Prin urmare, examinarea micronucleului se limitează la celulele care au fost supuse procesului de mitoză în timpul sau ulterior tratamentului. CitoB este agentul utilizat cel mai frecvent pentru blocarea citocinezei deoarece inhibă asamblarea actinei împiedicând astfel separarea celulelor fiice după mitoză, conducând la formarea de celule binucleate (6) (66) (67). Efectul substanței chimice de testat asupra cineticii proliferării celulare poate fi măsurat concomitent atunci când se utilizează citoB. CitoB se utilizează ca agent de blocare a citocinezei atunci când sunt utilizate limfocite umane, deoarece durata ciclului celular este variabilă în funcție de donatori și pentru că nu toate limfocitele reacționează la stimularea cu PHA. Utilizarea de citoB nu este obligatorie pentru alte tipuri de celule în cazul în care se poate demonstra că acestea au efectuat diviziunea astfel cum este descris la punctul 27. În plus, citoB nu este utilizată, în general, atunci când sunt evaluate probele de micronucleu utilizând metode citometrice de flux.

Pentru fiecare tip de celulă, laboratorul determină concentrația adecvată de citoB pentru a obține frecvența optimă de celule binucleate în culturile martor tratate cu solvent și dovedește capacitatea acestuia de a produce suficiente celule binucleate pentru examinare. Concentrația adecvată de citoB este cuprinsă, în general, între 3 și 6 µg/ml (19).

Măsurarea proliferării celulare și a citotoxicității și alegerea concentrațiilor de tratament

În momentul determinării celei mai mari concentrații a substanței chimice de testat, se evită concentrațiile susceptibile să producă răspunsuri pozitive date de artefacte, cum ar fi cele care produc citotoxicitate excesivă (a se vedea punctul 29), precipitate în mediul de cultură (a se vedea punctul 30) sau modificări importante de pH sau osmolalitate (a se vedea punctul 9). În cazul în care substanța chimică de testat provoacă o modificare importantă în pH-ul mediului în timpul adăugării sale, pH-ul ar putea fi ajustat prin tamponarea mediului final de tratament astfel încât să se evite rezultate pozitive date de artefacte și să se mențină condiții de cultură corespunzătoare.

Măsurători ale proliferării celulare se efectuează pentru a asigura că un număr suficient de celule tratate au efectuat mitoză în timpul testului și că tratamentele sunt realizate la niveluri adecvate de citotoxicitate (a se vedea punctul 29). Citotoxicitatea se determină în experimentul principal, cu sau fără activare metabolică, utilizând un indicator corespunzător de moarte și creștere celulară (a se vedea punctele 26 și 27). În timp ce evaluarea citotoxicității pe un prim test inițial poate fi utilă pentru o mai bună definire a concentrațiilor care urmează să fie utilizate în experimentul principal, un test inițial nu este obligatoriu. În cazul în care este efectuat, acesta nu trebuie să înlocuiască măsurarea citotoxicității în experimentul principal.

Tratarea culturilor cu citoB și măsurarea frecvențelor relative ale celulelor mononucleate, binucleate și multinucleate în fiecare cultură furnizează o metodă precisă de cuantificare a efectului unui tratament asupra proliferării celulare și asupra activității citotoxice sau citostatice (6) și asigură luarea în calcul doar a celulelor care s-au divizat în timpul tratamentului sau după acesta. Indicele de proliferare a celulelor a căror citocineză a fost blocată (CBPI) (6) (27) (68) sau indicele de replicație (RI) de la cel puțin 500 de celule pentru fiecare cultură (a se vedea formulele din appendicele 2) sunt recomandate pentru estimarea activității citotoxice și citostatice ale unui tratament prin compararea valorilor obținute pentru culturile tratate și cele martor. Evaluarea altor indicatori de citotoxicitate (de exemplu, integritatea celulară, apoptoză, necroză, numărarea celulelor în metafază, ciclul celular) poate furniza informații utile, dar nu trebuie să înlocuiască CBPI sau RI.

În studiile fără citoB este necesar să se demonstreze că celulele în culturi s-au divizat, astfel încât o parte substanțială din celule examinate au efectuat diviziunea în timpul sau ulterior tratamentului cu substanța chimică de testat, în caz contrar existând riscul de producere a unor răspunsuri fals negative. Măsurarea dublării relative a populației (RPD) sau a creșterii relative a numărului de celule (RICC) se recomandă pentru estimarea activității citotoxice și citostatice a unui tratament (17) (68) (69) (70) (71) (a se vedea formulele din apendicele 2). În perioade de prelevare extinse (de exemplu, tratamente de 1,5-2 ori durata ciclului celular normal și recoltare după un ciclu celular normal de 1,52 ori suplimentar, conducând la perioade de prelevare mai mari cu de 3-4 ori durata ciclului celular normal în total, astfel cum sunt descrise la punctele 38 și 39), RPD ar putea subestima citotoxicitatea (71). În aceste circumstanțe, RICC ar putea fi o măsură mai potrivită sau evaluarea citotoxicității după o perioadă de 1,5-2 ori durata ciclului celular normal ar fi o estimare utilă. Evaluarea altor markeri de citotoxicitate sau citostază (de exemplu, integritatea celulară, apoptoză, necroză, numărarea celulelor în metafază, indicele de proliferare (PI), ciclul celular, punțile nucleoplasmice sau mugurii nucleari) ar putea furniza informații suplimentare utile, dar nu trebuie să înlocuiască nici RPD, nici RICC.

Se evaluează cel puțin trei concentrații de testat (fără a include martorii solvent și pozitivi) care îndeplinesc criteriile de acceptabilitate (citotoxicitate adecvată, număr de celule etc.). Indiferent de tipurile de celule (linii celulare sau culturi primare de limfocite), fiecare concentrație se poate testa fie pe culturi replicate tratate, fie pe culturi unice tratate. În timp ce utilizarea a două culturi tratate este recomandată, culturile unice sunt acceptabile, de asemenea, cu condiția ca același număr total de celule să fie examinat atât pentru culturi unice, cât și pentru culturi duplicate. Utilizarea de culturi unice este deosebit de relevantă atunci când se evaluează mai mult de 3 concentrații (a se vedea punctele 44-45). Rezultatele obținute din culturi replici independente la o anumită concentrație pot fi reunite în vederea analizei datelor. În cazul substanțelor chimice de testat cu citotoxicitate ușoară sau fără citotoxicitate, sunt adecvate, de regulă, intervale de concentrație de aproximativ 2 până la 3 ori mai mari. În prezența citotoxicității, concentrațiile de testat selectate trebuie să acopere o plajă de valori de la producerea citotoxicității astfel cum este descris la punctul 29 și să includă concentrații la care există citotoxicitate moderată și ușoară sau nu există citotoxicitate. Multe substanțe chimice de testat prezintă curbe concentrație-răspuns cu pante puternice, iar pentru a obține date la un nivel scăzut și moderat de citotoxicitate sau pentru a studia în detaliu relația doză-răspuns, va fi necesară utilizarea concentrațiilor cu spațiu de separare redus și/sau mai mult de trei concentrații (culturi unice sau replici), în special în situațiile în care este necesară repetarea experimentului (a se vedea punctul 60).

În cazul în care concentrația maximă se bazează pe citotoxicitate, cea mai mare concentrație trebuie să vizeze atingerea unui nivel de citotoxicitate $55 \pm 5 \%$ utilizând parametrii de citotoxicitate recomandați (și anume, reducerea RICC și RPD pentru linii celulare atunci când nu se utilizează citoB și reducerea CBPI sau RI atunci când se utilizează citoB la $45 \pm 5 \%$ a martorului negativ testat în paralel) (72). Se acordă atenție deosebită interpretării rezultatelor pozitive care se găsesc numai la limita superioară a acestei plaje de valori de toxicitate de $55 \pm 5 \%$ (71).

În cazul substanțelor chimice de testat cu solubilitate redusă care nu sunt citotoxice la concentrații mai mici decât concentrația minimă de insolubilitate, cea mai mare concentrație analizată produce o turbiditate sau un precipitat vizibil cu ochiul liber sau cu ajutorul unui microscop inversat la sfârșitul tratamentului cu substanța chimică de testat. Chiar dacă se manifestă citotoxicitate la un nivel sub concentrația minimă de insolubilitate, se recomandă testarea la o singură concentrație care produce turbiditate sau cu un precipitat vizibil deoarece pot rezulta efecte date de artefacte din precipitat. La concentrația care produce un precipitat, se acordă atenție deosebită pentru a asigura că precipitatul nu interferează cu desfășurarea testului (de exemplu, colorare sau examinare). Determinarea solubilității în mediul de cultură înainte de experiment poate fi utilă.

În cazul în care nu se constată citotoxicitate sau precipitat, concentrația maximă de testare trebuie să corespundă cu 10 mM, 2 mg/ml sau 2 μ l/ml, fiind reținută cea mai mică valoare (73) (74) (75). În cazul în care substanța chimică de testat nu are o compoziție definită, de exemplu, o substanță cu compoziție necunoscută sau variabilă, produse de reacție complexă sau materii biologice (UVCB) (76), extract de mediu etc., concentrația maximă ar trebui să fie mai mare (de exemplu, 5 mg/ml) în absența citotoxicității suficiente, pentru a crește concentrația fiecărei componente. Cu toate acestea, trebuie remarcat faptul că aceste cerințe pot fi diferite de cele pentru produsele farmaceutice umane (93).

Martori

La fiecare moment de recoltare se includ martori negativi testați în paralel (a se vedea punctul 21) constituiți dintr-un solvent singur în mediul de tratare și care se tratează în aceleași condiții precum culturile de tratare.

Martorii pozitivi testați în paralel sunt necesari pentru a demonstra abilitatea laboratorului în identificarea substanțelor clastogene și aneugene în condițiile prevăzute în protocolul de testare utilizat și eficacitatea sistemului exogen de activare metabolică (după caz). Tabelul 1 de mai jos prezintă exemple de martori pozitivi. Alte substanțe chimice martor pozitive pot fi utilizate, dacă acest lucru este justificat.

În prezent, niciun aneugen cunoscut nu necesită activare metabolică pentru a prezenta activitate genotoxică (17). Întrucât testele *in vitro* de genotoxicitate pe celule de mamifere sunt suficient de standardizate pentru tratamentele pe termen scurt efectuate concomitent cu și fără activare metabolică utilizând aceeași durată de tratament, utilizarea de martori pozitivi poate fi limitată la un clastogen care necesită activare metabolică. În acest caz, un singur rezultat clastogenic al martorului pozitiv va demonstra atât activitatea sistemului de activare metabolică, cât și capacitatea de reacție a sistemului de testare. Cu toate acestea, tratamentul de lungă durată (fără S9) necesită propriul martor pozitiv deoarece durata tratamentului va fi diferită față de testul care utilizează activare metabolică. În cazul în care un clastogen este selectat ca unicul martor pozitiv pentru tratamentul pe termen scurt cu și fără activare metabolică, se selectează un aneugen pentru tratamentul pe termen lung fără activare metabolică. Martorii pozitivi atât pentru clastogenitate, cât și pentru aneugenitate se utilizează pentru celulele competente din punct de vedere metabolic care nu necesită S9.

Fiecare martor pozitiv se utilizează în una sau mai multe concentrații susceptibile să determine creșteri reproducibile și detectabile ale frecvenței de fond pentru a demonstra sensibilitatea sistemului de testare (și anume, efectele sunt clare, dar nu dezvăluie imediat examinătorului identitatea lamelor codate) și rezultatul nu trebuie să fie compromis de citotoxicitatea care depășește limitele specificate în prezenta metoda de testare.

Tabelul 1.

Substanțe chimice de referință recomandate pentru evaluarea competenței de laborator și pentru selectarea de martori pozitivi

Categorie	Substanță chimică	NR. CAS
1. Clastogeni activi fără activare metabolică		
	Metansulfonat de metil	66-27-3
	Mitomicină C	50-07-7
	4-nitrochinolină-N oxid	56-57-5
	Cistozină arabinozidă	147-94-4
2. Clastogeni care necesită activare metabolică		
	Benzo(a)piren	50-32-8
	Ciclofosfamidă	50-18-0

Categorie	Substanță chimică	NR. CAS
3. Aneugeni		
	Colchicină	64-86-8
	Vinblastină	143-67-9

PROCEDURĂ

Schema de tratament

Pentru a maximiza probabilitatea detectării unei acțiuni aneugene sau clastogene într-un stadiu specific al ciclului celular, este important ca un număr suficient de celule reprezentând toate etapele diferite ale ciclului celular să fie tratate cu substanța chimică de testat. Toate tratamentele trebuie să înceapă și să se încheie în timpul etapei de creștere exponențială a celulelor, iar celulele trebuie să continue să crească până la momentul prelevării de probe. Schema de tratament pentru liniile celulare și culturile de celule primare poate, prin urmare, să difere într-o oarecare măsură de cea pentru limfocite, care necesită stimulare mitogenică pentru a începe ciclul celular (17). În cazul limfocitelor, cea mai eficientă abordare constă în inițierea tratamentului cu substanța chimică de testat la 44-48 de ore după stimularea cu PHA, atunci când celulele se vor împărți asincron (6).

Datele publicate (19) indică faptul că majoritatea substanțelor aneugene și clastogene sunt detectate în urma unui tratament de scurtă durată, de 3 până la 6 ore, în prezența și în absența preparatului S9, urmat de îndepărtarea substanței chimice de testat și prelevarea de probe la un timp echivalent cu aproximativ de 1,5-2,0 ori durată ciclului celular normal de la inițierea tratamentului (7).

Cu toate acestea, pentru o evaluare aprofundată, care ar fi necesară pentru a încheia un rezultat negativ, toate cele trei condiții experimentale de mai jos se efectuează utilizând atât un tratament pe termen scurt cu și fără activare metabolică, cât și un tratament pe termen lung fără activare metabolică (a se vedea punctele 56, 57 și 58):

- Se recomandă expunerea celulelor la substanța chimică de testat fără activare metabolică, timp de 3-6 ore și prelevarea de probe după un timp echivalent cu aproximativ de 1,5-2,0 ori durată ciclului celular normal de la inițierea tratamentului (19),
- Se recomandă expunerea celulelor la substanța de testat în prezența activării metabolice, timp de 3-6 ore, și prelevarea de probe după un timp echivalent cu aproximativ de 1,5-2,0 ori durată ciclului celular normal de la inițierea tratamentului (19),
- Celulele se expun continuu fără activare metabolică până în momentul prelevării probelor după un timp echivalent cu aproximativ de 1,5-2,0 ori durată ciclului celular normal.

În cazul în care oricare dintre condițiile experimentale de mai sus conduce la un rezultat pozitiv, se poate să nu fie necesar să se investigheze niciun alt regim de tratament dintre celelalte.

În cazul în care se cunoaște sau se presupune că substanța chimică de testat afectează durată ciclului celular (de exemplu, dacă se testează nucleotide analoage), în special pentru celule competente cu p53 (35) (36) (77), perioadele de prelevare sau recuperare pot fi extinse cu o perioadă suplimentară de 1,5-2,0 ori durată ciclului celular normal (și anume, totalul de 3,0 până la 4,0 ori durată ciclului celular după inițierea tratamentelor pe termen scurt și pe termen lung). Aceste opțiuni vizează situațiile în care pot exista preocupări referitoare la posibilele interacțiuni dintre substanța chimică de testat și citoB. În cazul în care se utilizează perioade extinse de prelevare (și anume, timp total de cultură de 3,0 până la 4,0 ori durată ciclului celular), se acordă atenție deosebită pentru a se asigura că celulele sunt încă în diviziune activă. De exemplu, în cazul limfocitelor, creșterea exponențială poate să intre în declin la 96 de ore după stimulare și culturile monostrat de celule ar putea deveni confluențe.

În tabelul 2 se rezumă schemele de tratament celular propuse. Aceste scheme de tratament generale pot fi modificate (și trebuie justificate) în funcție de stabilitatea sau de reactivitatea substanței chimice de testat sau de caracteristicile de creștere particulare ale celulelor utilizate.

Tabelul 2

Tratamentul celulelor și timpii de recoltă pentru testul MNvit

Limfocite, celule primare și linii celulare tratate <u>cu</u> citoB	+ S9 Tratament de scurtă durată	Se tratează timp de 3-6 ore în prezența S9; se înlătură S9 și mediul de tratare; se adaugă mediu proaspăt și citoB; se recoltează la de 1,5-2,0 ori durata ciclului celular normal de la inițierea tratamentului.
	– S9 Tratament de scurtă durată	Se tratează timp de 3-6 ore; se înlătură mediul de tratare; se adaugă mediu proaspăt și citoB; se recoltează timp de 1,5-2,0 cicluri celulare normale după inițierea tratamentului.
	– S9 Tratament pe perioadă avansată	Se tratează timp de 1,5-2 cicluri celulare normale în prezența citoB; se recoltează la sfârșitul perioadei de tratament.

Linii celulare tratate fără citoB

(Schemă de tratament identică cu schemele de tratament descrise mai sus, cu excepția faptului că nu se adaugă citoB)

Pentru culturile monostrat, celule mitotice (recunoscute după forma rotundă a acestora și după faptul că se detașează de pe suprafață) pot fi prezente la sfârșitul perioadei de tratament de 3-6 ore. Deoarece celulele mitotice se detașează ușor, acestea pot fi pierdute în momentul înlăturării mediului care conține substanța chimică de testat. În cazul în care există dovezi privind o creștere substanțială a numărului de celule mitotice în comparație cu martorii, indicând probabil inhibarea fazei mitotice, celulele se colectează prin centrifugare și se adaugă înapoi la culturi pentru a evita pierderea de celule în mitoză și a celor cu risc de micronuclee/ aberație cromozomială la momentul recoltării.

Recoltarea celulelor și pregătirea lamelor

Fiecare cultură se recoltează și se prelucrează în mod separat. Prepararea celulelor poate implica tratament hipotonic, dar această etapă nu este necesară dacă celulele sunt răspândite în mod corespunzător în alt mod. Pot fi utilizate diferite tehnici pentru prepararea lamelor, cu condiția ca preparatele celulare obținute pentru examinare să fie de foarte bună calitate. Celulele cu membrană celulară intactă și cu citoplasmă intactă se păstrează pentru a permite detectarea de micronuclee și (în metoda de blocare a citocinezei) identificarea fiabilă a celulelor binucleate.

Lamele pot fi colorate prin metode diferite precum Giemsa sau coloranți fluorescenți specifici ai ADN. Utilizarea unor coloranți fluorescenți adecvați [de exemplu, oranj de acridină (78) sau Hoechst 33258 plus pironină-Y (79)] poate elimina o parte dintre artefactele asociate utilizării unui colorant nespecific al ADN. Anticorpii antikinetocori, metoda FISH cu sonde ADN pancentrometrice sau marcarea *in situ* cu ajutorul primerilor pancentrometrici, împreună cu un colorant de contrast al ADN adecvat pot fi utilizați pentru a identifica conținutul (cromozomi întregi vor fi colorați, în timp ce fragmentele de cromozomi acentrici nu vor fi colorați) micronucleelor dacă informațiile de ordin mecanic cu privire la formarea acestora prezintă interes (16) (17). Alte metode de diferențiere a efectelor clastogene și aneugene pot fi utilizate, cu condiția ca eficacitatea acestora să fi fost demonstrată și validată. De exemplu, pentru anumite linii celulare, măsurătorile nucleelor sub 2N ca stări de hipodiploidie utilizând tehnici precum analiza imaginii, citometria cu scanare cu laser sau citometria de flux ar putea, de asemenea, să furnizeze informații utile (80) (81) (82). Observațiile morfologice ale nucleelor ar putea oferi, de asemenea, indicații privind o posibilă aneuploidie. În plus, un test pentru detectarea aberațiilor cromozomiale în metafază, de preferință în același tip de celulă și protocol cu sensibilitate comparabilă, ar putea fi, de asemenea, un instrument util pentru a determina dacă micronucleele sunt cauzate de ruptură cromozomială (având în vedere faptul că pierderea cromozomială nu ar fi detectată în testul de aberație cromozomială).

Analiză

Toate lamele, inclusiv cele cu solvent și cele cu martori netratați (dacă este cazul) și pozitivi, se codifică în mod independent înainte de examinarea la microscop a frecvenței micronucleelor. Se utilizează tehnici corespunzătoare pentru controlul oricărui rezultat denaturat sau abateri atunci când se utilizează un sistem automat de examinare, de exemplu, citometria de flux, citometria cu scanare laser sau analiza imaginii. Indiferent de platforma automată utilizată pentru exprimarea numărului de micronuclee, CBPI, RI, RICC sau RPD se evaluează concomitent.

În culturile tratate cu citoB, frecvența micronucleelor se analizează în cel puțin 2000 de celule binucleate pe concentrație și probă martor (83), împărțite în mod egal între duplicate, dacă se utilizează duplicate. În cazul culturilor unice pe doză (a se vedea punctul 28), se analizează cel puțin 2000 de celule binucleate pe cultură (83) pentru cultura unică respectivă. În cazul în care numărul de celule binucleate disponibile pentru examinare pentru fiecare concentrație este în mod considerabil mai mic de 1000 celule pe cultură (pentru culturile duplicate) sau 2000 (pentru culturi unice) și în cazul în care nu se detectează o creștere semnificativă a numărului de micronuclee, testul se repetă utilizând mai multe celule sau la concentrații mai puțin toxice, în funcție de situație. Se acordă o deosebită atenție pentru a evita examinarea celulelor binucleate cu formă neregulată sau ale căror două nuclee prezintă o diferență de mărime considerabilă. De asemenea, celulele binucleate nu trebuie confundate cu celulele multinucleate răspândite neuniform. Celulele care conțin mai mult de două nuclee principale nu se analizează pentru micronuclee deoarece frecvența de referință a micronucleelor poate fi mai mare în acest tip de celule (84). Examinarea celulelor mononucleate este acceptabilă în cazul în care s-a demonstrat că substanța chimică de testat interferează cu activitatea citoB. Repetarea testului fără citoB poate fi utilă în astfel de cazuri. Examinarea celulelor mononucleate în plus față de celulele binucleate (85) (86) poate oferi informații utile, dar nu este obligatorie.

Pentru liniile celulare testate fără tratament citoB, micronucleele se analizează pentru cel puțin 2000 de celule pentru fiecare concentrație de testare și probă martor (83), împărțite în mod egal între duplicate, dacă se utilizează duplicate. Atunci când se utilizează culturi unice pentru fiecare concentrație (a se vedea punctul 28), se examinează cel puțin 2000 de celule pe cultură pentru cultură unică respectivă. În cazul în care numărul de celule disponibile pentru examinare pentru fiecare concentrație este în mod considerabil mai mic de 1000 celule pe cultură (pentru culturile duplicate) sau 2000 (pentru culturi unice) și în cazul în care nu se detectează o creștere semnificativă a numărului de micronuclee, testul se repetă utilizând mai multe celule sau la concentrații mai puțin toxice, în funcție de situație.

Atunci când se utilizează citoB, se determină CBPI sau RI pentru a evalua proliferarea celulară (a se vedea apendicele 2) utilizând cel puțin 500 de celule pe cultură. Atunci când tratamentele se efectuează în absența citoB, este esențial să se demonstreze că celulele în culturi s-au divizat, astfel cum a fost discutat la punctele 24-28.

Competența de laborator

Pentru a stabili o experiență suficientă în materie de testare înainte de utilizarea acestora pentru efectuarea testelor de rutină, laboratorul trebuie să fi efectuat o serie de experiențe cu substanțe chimice de referință pozitive acționând prin diferite mecanisme (cel puțin una cu și una fără activare metabolică și una acționând prin intermediul unui mecanism aneugenic și selecționate dintre substanțele chimice enumerate în tabelul 1) și diferiți martori negativi (inclusiv culturi netratate și diferiți solvenți/vehicul). Aceste răspunsuri ale martorilor pozitivi și negativi trebuie să fie în concordanță cu referințele bibliografice. Acest lucru nu se aplică laboratoarelor care au experiență, și anume, cele care au o bază de date anterioară disponibilă, astfel cum este definit la punctele 49-52.

O serie de substanțe chimice martor pozitive (a se vedea tabelul 1) se analizează cu tratamente de scurtă și de lungă durată în absența activării metabolice, precum și, de asemenea, cu tratament de scurtă durată în prezența activării metabolice, pentru a demonstra capacitatea de a detecta substanțe chimice clastogene și aneugene, pentru a determina eficacitatea sistemului de activare metabolică și pentru a demonstra caracterul adecvat al procedurilor de examinare (analiză vizuală microscopică, citometria de flux, citometria cu scanare laser sau analiza imaginii). O plajă de valori de concentrații ale substanțelor chimice selectate se alege astfel încât să se obțină creșteri reproductibile și legate de concentrație peste nivelul de fond pentru a demonstra sensibilitatea și gama dinamică a sistemului de testare.

Date privind martorii testați anterior

Laboratorul trebuie să stabilească:

- o plajă de valori și o distribuție a martorilor pozitivi testați anterior,
- o plajă de valori și o distribuție a martorilor negativi (netratați, solvenți) testați anterior.

La obținerea primelor date pentru o distribuție a martorilor negativi testați anterior, martorii negativi testați în paralel trebuie să fie în concordanță cu datele publicate referitoare la martori negativi, în cazul în care acestea există. Pe măsură ce tot mai multe date experimentale se adaugă la distribuția martorilor, martorii negativi testați în paralel trebuie să fie, în mod ideal, de până la 95 % din limitele de control ale respectivei distribuții (87) (88). Baza de date privind martori negativi testați anterior a laboratorului trebuie să fie construită inițial cu cel puțin 10 experimente, dar ar fi de preferat ca aceasta să conțină cel puțin 20 de experimente efectuate în conformitate cu condiții experimentale comparabile. Laboratoarele trebuie să utilizeze metode de control al calității precum grafice de control [de exemplu, diagrame C și X-bar (88)] pentru a identifica gradul de variabilitate al datelor privind martorii negativi și pozitivi ale acestora și pentru a dovedi faptul că metodologia se află „sub control” în cadrul respectivului laborator (83). Referințele bibliografice prezintă recomandări suplimentare privind modalitatea în care se pot constitui și utiliza datele anterioare (și anume, criteriile de includere și de excludere a datelor în datele istorice și criteriile de acceptabilitate pentru un anumit experiment) (87).

Orice modificare la protocolul experimental se ia în considerare în ceea ce privește coerența datelor cu bazele de date cu privire la martorii testați anterior existente ale laboratorului. Orice inconsecvență majoră trebuie să conducă la stabilirea unei noi baze de date privind martorii testați anterior.

Datele privind martorii negativi trebuie să fie constituite din incidența celulelor micronucleate dintr-o cultură unică sau suma dintre culturile replicate, astfel cum este descris la punctul 28. Martorii negativi testați în paralel trebuie să fie, în mod ideal, de până la limitele de control de 95 % ale distribuției bazelor de date privind martorii negativi testați anterior ale laboratorului (87) (88). În cazul în care datele privind martorii negativi testați în paralel se situează în afara limitelor de control de 95 %, acestea pot fi acceptabile pentru a fi incluse în distribuția martorilor testați anterior, în măsura în care datele respective nu reprezintă valori aberante extreme și există dovezi că sistemul de testare se află „sub control” (a se vedea punctul 50) și nu există nicio dovadă de defecțiuni tehnice sau umane.

DATE ȘI RAPORTARE

Prezentarea rezultatelor

În cazul în care se utilizează tehnica blocării citocinezei, doar frecvențele celulelor binucleate prezentând micronuclee (independent de numărul de micronuclee dintr-o celulă) se utilizează pentru evaluarea inducției de micronuclee. Examinarea numărului celulelor prezentând unul, două sau mai multe micronuclee poate fi raportată separat și ar putea oferi informații utile, dar nu este obligatorie.

Se efectuează măsurători paralele de citotoxicitate și/sau citostază pentru toate tipurile de culturi tratate, martor negative și pozitive (16). De asemenea, se calculează CBPI sau RI pentru toate culturile tratate și cele martor ca măsurători de întârziere a ciclului celular atunci când se utilizează metoda blocării citocinezei. În absența citoB, se utilizează RPD sau RICC (a se vedea apendicele 2).

Datele se indică individual pentru fiecare cultură. În plus, toate datele se sintetizează sub formă de tabel.

Criterii de acceptabilitate

Acceptarea unui test se bazează pe următoarele criterii:

- Martorul negativ testat în paralel este considerat acceptabil pentru adăugarea în baza de date privind martorii negativi testați anterior a laboratorului, astfel cum este descris la punctul 50.
- Martorii pozitivi testați în paralel (a se vedea punctul 50) trebuie să determine reacții care sunt compatibile cu baza de date cu privire la martorii testați anterior a laboratorului și trebuie să producă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel.
- Criteriile de proliferare celulară în martorul solvent trebuie să fie îndeplinite (punctele 25-27).
- Toate condițiile experimentale au fost testate, cu excepția cazului în care una a condus la rezultate pozitive (punctele 36-40).
- Un număr adecvat de celule și concentrații sunt analizabile (punctele 28 și 44-46).
- Criteriile de selecție a concentrației maxime sunt conforme cu cele descrise la punctele 24-31.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar pozitivă în cazul în care, în oricare dintre condițiile experimentale examinate (a se vedea punctele 36-39):

- cel puțin una dintre concentrațiile de testare prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel (89)
- atunci când este evaluată prin intermediul unui test de stabilire a tendinței corespunzător, creșterea depinde de doză în cel puțin o condiție experimentală (a se vedea punctul 28)
- oricare dintre rezultate se află în afara distribuției de date privind martori negativi testați anterior (de exemplu, limite de control de 95 % pe baza distribuției Poisson; a se vedea punctul 52).

La îndeplinirea tuturor acestor criterii, substanța chimică de testat este considerată, prin urmare, capabilă de a induce rupturi cromozomiale și/sau câștig sau pierdere în cadrul respectivului sistem de testare. Referințele bibliografice prezintă, de asemenea, recomandări pentru cele mai adecvate metode statistice (90) (91) (92).

Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar negativă în cazul în care, în toate condițiile experimentale examinate (a se vedea punctele 36-39):

- niciuna dintre concentrațiile de testare nu prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel,
- atunci când este evaluată prin intermediul unui test de stabilire a tendinței, nu se înregistrează nicio creștere legată de concentrație,
- toate rezultatele se situează în interiorul distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limite de control de 95 % pe baza distribuției Poisson; a se vedea punctul 52).

Substanța chimică testată este considerată, prin urmare, incapabilă de a induce rupturi cromozomiale și/sau câștig sau pierdere în cadrul respectivului sistem de testare. Referințele bibliografice prezintă, de asemenea, recomandări pentru cele mai adecvate metode statistice (90) (91) (92).

Nu există nicio cerință referitoare la verificarea unui răspuns clar pozitiv sau negativ.

În cazul în care răspunsul nu este în mod clar negativ, nici în mod clar pozitiv astfel cum este descris mai sus și/sau pentru a asista la stabilirea relevanței biologice a unui rezultat, datele se evaluează de către experți și/sau prin intermediul unor investigații suplimentare. Examinarea de celule suplimentare (dacă este cazul) sau repetarea experimentului folosind posibile condiții experimentale modificate [de exemplu, intervale dintre concentrații, alte condiții de activare metabolică [și anume, concentrație S9 sau origine S9]] ar putea fi utile.

În cazuri rare, chiar și după efectuarea de investigații suplimentare, setul de date nu va permite o concluzie pozitivă sau negativă și, prin urmare, aceasta va fi stabilită drept echivocă.

Substanțele chimice de testat care induc micronuclee în testul MNvit pot efectua acest lucru deoarece induc ruptură cromozomială, pierdere cromozomială sau o combinație a acestor două. Analize suplimentare utilizând anticorpi antikinetocori, sonde centrometrice *in situ* sau alte metode pot fi utilizate pentru a determina dacă mecanismul inducției de micronuclee se datorează activității clastogene și/sau aneugene.

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanță chimică de testat:

- sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile;
- stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște;
- reactivitatea substanței chimice de testat cu solventul/vehiculul sau mediul de cultură celulară;
- solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent, dacă se cunosc;
- măsurarea pH-ului, a osmolalității și a precipitatului în mediul de cultură în care s-a adăugat substanța chimică de testat, după caz.

Substanță monocomponentă:

- aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;
- identificare chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS, Codul SMILES sau InChI, formula structurală, puritatea, identitatea impurităților chimice, după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

- în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Solvent:

- justificarea alegerii solventului;
- procentul de solvent în mediul final de cultură

Celule:

- tipul și sursa celulelor utilizate;
- caracterul adecvat al tipului de celulă utilizat;
- absența micoplasmei, în cazul liniilor celulare;
- pentru liniile celulare, informații privind durata ciclului celular sau indicele de proliferare;
- în cazul în care se utilizează limfocite, sexul donatorilor de sânge, vârstă și orice informație relevantă cu privire la donator, sângele integral sau limfocite separate, mitogenul utilizat;
- durata normală a unui ciclu celular (martor negativ);
- numărul de pasaje, dacă este disponibil, pentru liniile celulare;
- metodele de întreținere a culturilor celulare, pentru liniile celulare;
- numărul modal de cromozomi, pentru liniile celulare.

Condiții de testare:

- identitatea substanței de blocare a citocinezei (de exemplu, citoB), dacă se utilizează, concentrația acesteia și durata de expunere a celulelor;
- concentrația substanței chimice de testat, exprimată ca o concentrație finală în mediu de cultură (de exemplu, µg sau mg/ml sau mM din mediul de cultură);
- justificarea selecției concentrațiilor și a numărului de culturi, inclusiv date privind citotoxicitatea și limitele de solubilitate;
- compoziția mediului, concentrația de CO₂, dacă este cazul, gradul de umiditate;
- concentrația (și/sau volumul) de solvent și substanță chimică de testat adăugate în mediul de cultură;
- temperatura și timpul de incubație;
- durata tratamentului;
- perioada de recoltă după tratament;
- densitatea celulară la momentul însămânțării, dacă se aplică;
- tipul și compoziția sistemului de activare metabolică (sursă S9, metoda de preparare a amestecului S9, concentrația sau volumul amestecului S9 și S9 în mediul final de cultură, controalele de calitate ale S9 (de exemplu, activitate enzimatică, sterilitate, capacitatea metabolică);
- substanțele martor pozitive și negative, concentrații finale, condițiile și durata tratamentului și perioadele de recuperare;
- metodele de preparare a lamelor și tehnica de colorare utilizată;
- criteriile pentru examinarea celulelor micronucleate (selecția celulelor analizabile și identificarea micronucleului);
- numărul de celule analizate;

- metode de măsurare a citotoxicității;
- orice alte informații suplimentare cu privire la citotoxicitate și metoda utilizată;
- criteriile în funcție de care un studiu poate fi considerat ca fiind pozitiv, negativ sau echivoc;
- metoda (metodele) de analiză statistică utilizată (utilizate);
- metode, precum utilizarea de anticorpi kinetocori sau sonde pancentromerice, pentru a determina dacă micronucleele conțin cromozomi întregi sau cromozomi fragmentați, dacă se aplică;
- metode utilizate pentru a determina pH-ul, osmolalitatea și precipitarea.

Rezultate:

- definiția celulelor acceptabile pentru analiză;
- în absența cytoB, numărul celulelor tratate și numărul de celule recoltate pentru fiecare cultură în cazul liniilor celulare;
- metoda de măsurare a citotoxicității utilizată, de exemplu, CBPI sau RI în cazul metodei de blocare a citocinezei; RICC sau RPD atunci când nu se utilizează metode de blocare a citocinezei; alte observații, dacă este cazul (de exemplu, gradul de confluență celulară, apoptază, necroză, numărarea celulelor în metafază, frecvența celulelor binucleate);
- semne de precipitare și ora determinării;
- date privind pH-ul și osmolalitatea mediului de tratament, dacă acestea au fost determinate;
- distribuția celulelor mono-, bi- și multinucleate, dacă se utilizează o metodă de blocare a citocinezei;
- numărul de celule cu micronuclee, furnizat separat pentru fiecare cultură tratată și cultură martor, precizându-se dacă acestea provin din celule binucleate sau mononucleate, după caz;
- relația concentrație-răspuns, dacă este posibil;
- date (concentrație și solvenți) privind martorii negativi (solvent) și pozitivi testați în paralel;
- date cu privire la substanțele martor negative (solvent/vehicul) și pozitive testate anterior, cu intervale, valori medii și deviații standard și limite de control de 95 % pentru distribuție, precum și numărul datelor;
- analiză statistică; valorile P, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) OECD(2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, p. 1-4.
- (3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, p. 3-15.
- (4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, Vol. 43/172-173, p. 233-246.

- (5) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, p. 167-172.
- (6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, Vol. 2/5, p. 1084-1104.
- (7) Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research*, Vol. 161/2, p. 193-198.
- (8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 13/1, p. 34-43.
- (9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research*, Vol. 234/5, p. 9-20.
- (10) Miller, B.M. *et al.* (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis*, Vol. 6/4, p. 297-302.
- (11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis*, Vol. 8/4, p. 329-334.
- (12) Migliore, L. *et al.* (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research*, Vol. 319/3, p. 205-213.
- (13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis*, Vol. 8/6, p. 519-525.
- (14) Eastmond, D.A., D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research*, Vol. 322/1, p. 9-20.
- (15) Marshall, R.R. *et al.* (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research*, Vol. 372/2, p. 233-245.
- (16) Zijno, P. *et al.* (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 372/2, p. 211-219.
- (17) Kirsch-Volders *et al.* (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research*, Vol. 540/2, p. 153-163.
- (18) Capitolul B.10 din prezenta anexă: *Test in vitro de aberație cromozomială pe celule de mamifere*.
- (19) Lorge, E. *et al.* (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research*, Vol. 607/1, p. 13-36.
- (20) Clare, G. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 607/1, p. 37-60.
- (21) Aardema, M.J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, p. 61-87.
- (22) Wakata, A. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, p. 88-124.

- (23) Oliver, J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, p. 125-152.
- (24) Albertini, S. *et al.* (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, p. 187-208.
- (25) Miller, B. *et al.* (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, p. 45-59.
- (26) Miller, B. *et al.* (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research*, Vol. 410, p. 81-116.
- (27) Kalweit, S. *et al.* (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Research*, Vol. 439/2, p. 183-190.
- (28) Kersten, B. *et al.* (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 445/1, p. 55-71.
- (29) von der Hude, W. *et al.* (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Research*, Vol. 468/2, p. 137-163.
- (30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, p. 123-134.
- (31) Matsushima, T. *et al.* (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis*, Vol. 14/6, p. 569-580.
- (32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 607/1, p. 1-152.
- (33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Research*, Vol. 702/2, p. 139-147.
- (34) Hashimoto K. *et al.* (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 59/1, p. 28-36.
- (35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, p. 373-384.
- (36) Zhang, L.S. *et al.* (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters*, Vol. 347/3-4, p. 105-115.
- (37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November 2006, disponibil la: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Disponibil la: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (39) Corvi, R. *et al.* (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis*, Vol. 23/4, p. 271-283.

- (40) ILSI paper (draft). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research*.
- (41) Scott, D. *et al.* (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research*, Vol. 257/2, p. 147-205.
- (42) Morita, T. *et al.* (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research*, Vol. 268/2, p. 297-305.
- (43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, p. 789-886.
- (44) Long, L.H. *et al.* (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research*, Vol. 634/1-2, p. 177183.
- (45) Nessler, F. *et al.* (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation*, Vol. 49, p. 439-452.
- (46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 147/1-2, p. 29-36.
- (47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research*, Vol. 392, p. 11-18.
- (48) Payne, C.M. *et al.* (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, p. 825-840.
- (49) Bazin, E. *et al.* (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin, Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, p. 251-259.
- (50) Le Hegarat, L. *et al.* (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, p. 555-560.
- (51) Josse, R. *et al.* (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 27/3, p. 295-304.
- (52) Ehrlich, V. *et al.* (2002). Fumonisin B₁ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, Vol. 17/3, p. 257-260.
- (53) Knasmüller, S. *et al.* (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, Vol. 198/1-3, p. 315-328.
- (54) Gibson, D.P. *et al.* (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research*, Vol. 392/12, p. 61-70.
- (55) Bonassi, S. *et al.* (2001). Human MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 37/1, p. 31-45.
- (56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, Vol. 113/3-4, p. 173-215.
- (57) Ong, T.-m. *et al.* (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, p. 55-65.

- (58) Elliott, B.M. *et al.* (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, Vol. 7, p. 175-177.
- (59) Matsushima, T. *et al.* (1976). „A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems”, in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al.* (eds), Elsevier, North-Holland, p. 85-88.
- (60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28, p. 51-59.
- (61) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Disponibil la: <http://www.pops.int/>
- (62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, Vol.190/3, p. 225-8.
- (63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982). „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids”, in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, p. 91-103.
- (64) Zamora, P.O. *et al.* (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, p. 795-801.
- (65) Asakura, M. *et al.* (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, Vol. 652/2, p. 122-130.
- (66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*, Vol. 285/1, p. 35-44.
- (67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, Vol. 521/1-2, p. 103-112.
- (68) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2004). Corrigendum to „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group”. *Mutation Research*, 564, 97-100.
- (69) Lorge, E. *et al.* (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research*, Vol. 655/1-2, p. 1-3.
- (70) Surrallés, J. *et al.* (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 341/3, p. 169-184.
- (71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 724, p. 86-87.
- (72) Pfuhler, S. *et al.* (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, Vol. 723/2, p. 101-107.
- (73) OECD (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Disponibil la cerere.
- (74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 741, p. 32-56.
- (75) Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, p. 36-43.

- (76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. <http://www.epa.gov/opptintr/newchemicals/pubs/uvcb.txt>.
- (77) Sobol, Z. *et al.* (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research*, Vol. 746/1, p. 29-34.
- (78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research*, Vol. 120/4, p. 241-247.
- (79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research*, Vol. 120/4, p. 269-275.
- (80) Bryce, S.M. *et al.* (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, p. 280-286.
- (81) Nicolette, J. *et al.* (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, p. 355-362.
- (82) Shi, J., R. Bezabhe, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, Vol. 25/1, p. 33-40.
- (83) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, No.198, OECD Publishing, Paris.
- (84) Fenech, M. *et al.* (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 534/1-2, p. 65-75.
- (85) Elhajoui, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, Vol. 13/2, p. 193-8.
- (86) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, Vol. 85/8, p. 873-99.
- (87) Hayashi, M. *et al.* (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, p. 87-90.
- (88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). „*In vitro* micronucleus test”, in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, p. 463-467.
- (90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). Paik (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.
- (91) Galloway, S.M. *et al.* (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, p. 1-175.
- (92) Richardson, C. *et al.* (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, p. 141-154.
- (93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.
-

Apendicele 1

DEFINIȚII

Aneugen: orice substanță chimică sau proces care, prin interacțiunea cu componentele aparatului ciclului celular de diviziune mitotică și meiotică, conduce la apariția aneuploidiei în celule sau organisme.

Aneuploidie: orice deviere de la numărul diploid (sau haploid) normal de cromozomi, cu unul sau mai mulți cromozomi, dar nu cu un set (seturi) întreg (întregi) de cromozomi (poliploidie).

Apoptoză: moarte celulară programată caracterizată printr-o succesiune de etape conducând la dezintegrarea celulelor în particule membranare care sunt apoi eliminate prin fagocitoză sau excreție.

Proliferare celulară: creșterea numărului de celule ca rezultat al diviziunii celulare mitotice.

Centromer: regiunea ADN-ului unui cromozom unde cele două cromatide sunt legate între ele și pe care cei doi kinetocori sunt fixați unul lângă altul.

Substanță chimică: o substanță sau un amestec.

Concentrații: se referă la concentrațiile finale ale substanței chimice de testat în mediul de cultură.

Clastogen: Orice substanță chimică sau eveniment care cauzează aberații cromozomiale structurale în populații de celule sau organisme eucariote.

Citocineză: procesul de diviziune celulară care survine imediat după mitoză pentru a forma două celule fiice, fiecare conținând un nucleu unic.

Indice de proliferare a celulelor a căror citocineză a fost blocată (CBPI): proporția de celule provenite de la a doua diviziune în populația tratată în raport cu populația martor netratată (a se vedea formulele din apendicele 2).

Citostază: inhibarea creșterii celulare (a se vedea formulele din apendicele 2).

Citotoxicitate: Pentru testele reglementate în prezenta metodă de testare, efectuate în prezența citocalasinei B, citotoxicitatea este identificată ca fiind o reducere a indicelui de proliferare a celulelor a căror citocineză a fost blocată (CBPI) sau a indicelui de replicație (RI) a celulelor tratate în comparație cu martorul negativ (a se vedea punctul 26 și apendicele 2).

Pentru testele reglementate în prezenta metodă de testare, efectuate în absența citocalasinei B, citotoxicitatea este identificată ca fiind o reducere a dublării relative a populației (RPD) sau a creșterii relative a numărului de celule (RICC) a celulelor tratate în comparație cu martorul negativ (a se vedea punctul 27 și apendicele 2).

Genotoxic: termen general cuprinzând toate tipurile de leziuni ale ADN-ului sau ale cromozomilor, inclusiv rupturi, deleții, aducții, modificări și legături nucleotidice, rearanjări, mutații ale genelor, aberații cromozomiale și aneuploidie. Nu toate tipurile de efecte genotoxice au drept rezultat mutații sau leziuni cromozomiale stabile.

Celule în interfază: celule care nu se află în etapa de mitoză.

Kinetocor: structură proteică situată la nivelul centromerului unui cromozom la care se asociază fibrele fusoriale în timpul diviziunii celulare, permițând mișcarea ordonată a cromozomilor fiice către polii celulelor fiice.

Micronuclee: nuclee mici, separate de nucleele principale ale celulelor și prezente în plus față de acestea, produse în timpul telofazei mitozei sau meiozei de către fragmentele de cromozomi sau de cromozomii întregi întârziați.

Mitoză: divizarea nucleului celular, împărțită în general în profază, prometafază, metafază, anafază și telofază.

Indice mitotic (MI): numărul celulelor în metafază împărțit la numărul total de celule observate într-o populație de celule; un indicator al gradului de proliferare celulară a populației respective.

Mutagen: agent care produce o modificare ereditară uneia sau mai multor secvențe de perechi de bază de ADN genic sau structurii cromozomilor (aberații cromozomiale).

Nondisjunctie: lipsa separării unei perechi de cromatide, care nu reușesc să migreze în mod corespunzător către celulele fiice formate, fapt care determină prezența unui număr anormal de cromozomi în celulele fiice.

Status p53: proteina p53 este implicată în reglementarea circuitului de celule, apoptoză și regenerare a ADN-ului. Celulele cu deficit de proteină funcțională p53 care se află în imposibilitatea de a inhiba ciclul celular sau de a elimina celulele deteriorate prin intermediul apoptozei sau al altor mecanisme (de exemplu, inducția de regenerare a ADN-ului) relaționate cu funcțiile p53 care funcționează ca răspuns la deteriorarea ADN-ului sunt, în mod teoretic, mai predispușe la mutații ale genelor sau aberații cromozomiale.

Poliploidie: aberații cromozomiale numerice în celule sau organisme implicând unul sau mai multe seturi întregi de cromozomi, spre deosebire de unul sau mai mulți cromozomi izolați (aneuploidie).

Indice de proliferare: metodă de măsurare a citotoxicității atunci când nu se utilizează citoB (a se vedea formulele din apendicele 2).

Creștere relativă a numărului de celule (RICC): metodă de măsurare a citotoxicității atunci când nu se utilizează citoB (a se vedea formulele din apendicele 2).

Dublare relativă a populației (RPD): metodă de măsurare a citotoxicității atunci când nu se utilizează citoB (a se vedea formulele din apendicele 2).

Indice de replicație (RI): proporția ciclurilor de diviziune celulară complete într-o cultură tratată în raport cu cultura martor netratată, în timpul perioadei de expunere și de recuperare (a se vedea formulele din apendicele 2).

Fracția S9 a ficatului: supernatant din ficat omogenizat după centrifugare la 9 000 g, și anume extract din ficat crud.

Amenstec S9: amestecul dintre fracția S9 a ficatului și cofactorii necesari pentru activitatea metalică a enzimelor.

Martor solvent: Termen general pentru a defini culturile martor care primesc solventul singur utilizat pentru a dizolva substanța chimică de testat.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare de testare.

Martor netratat: culturi care nu beneficiază de niciun tratament (și anume, nici substanță chimică de testat, nici solvent), dar care sunt prelucrate în mod simultan în același mod precum culturile care primesc substanța chimică de testat.

Apendicele 2

FORMULE PENTRU EVALUAREA CITOTOXICITĂȚII

În cazul utilizării citoB, evaluarea citotoxicității se bazează pe **indicele de proliferare a celulelor a căror citocineză a fost blocată (CBPI)** sau pe **indicele de replicație (RI)** (17) (69). CBPI indică numărul mediu de nuclee pe celulă și poate fi utilizat pentru a calcula proliferarea celulară. RI indică numărul relativ de cicluri celulare pe celulă efectuate în timpul perioadei de expunere la citoB în culturile tratate comparativ cu culturile martor și poate fi utilizat pentru a calcula % de citostază:

$$\% \text{ Citostază} = 100 - 100[(CBPI_T - 1) \div (CBPI_C - 1)]$$

Și:

T = cultură tratată cu substanța chimică de testat

C = cultură martor

Unde:

$$CBPI = \frac{((\text{Nr. de celule mononucleate}) + (2 \times \text{Nr. de celule binucleate}) + (3 \times \text{Nr. de celule multinucleate}))}{(\text{Număr total de celule})}$$

Prin urmare, un CBPI egal cu 1 (toate celulele sunt mononucleate) este echivalent cu o citostază de 100 %.

Citostază = 100 - RI

$$RI = \frac{((\text{Nr. de celule binucleate}) + (2 \times \text{Nr. de celule multinucleate})) / (\text{Număr total de celule})_T}{((\text{Nr. de celule binucleate}) + (2 \times \text{Nr. de celule multinucleate})) / (\text{Număr total de celule})_C} \times 100$$

T = culturi tratate

C = culturi martor

Astfel, un RI de 53 % înseamnă că, în comparație cu numărul de celule care au efectuat o diviziune celulară pentru a forma celule binucleate și multinucleate în cultura martor, doar 53 % din acest număr au efectuat o diviziune în cultura tratată, și anume o citostază de 47 %.

În absența utilizării citoB, se recomandă evaluarea citotoxicității pe baza **creșterii relative a numărului de celule (RICC)** sau a **dublării relative a populației (RPD)** (69), întrucât ambele iau în considerare proporția de populații de celule care au efectuat o diviziune celulară.

$$RICC(\%) = \frac{(\text{Cresterea numărului de celule în culturile tratate (la final-la început)})}{(\text{Cresterea numărului de celule în culturile martor (la final-la început)})} \times 100$$

$$RPD(\%) = \frac{(\text{Nr. de dublări de populație în culturile tratate})}{(\text{Nr. de dublări de populație în culturile martor})} \times 100$$

unde:

Dublarea populației = $[\log(\text{numărul de celule post-tratament} \div \text{numărul inițial de celule})] \div \log 2$

Prin urmare, RICC sau RPD de 53 % indică o citotoxicitate/citostază de 47 %.

Utilizând indicii de proliferare (PI), citotoxicitatea poate fi evaluată prin intermediul numărării clonelor compuse din 1 celulă (cl1), 2 celule (cl2), 3 până la 4 celule (cl4) și 5 până la 8 celule (cl8).

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

PI este utilizat, de asemenea, ca un parametru fiabil și util de citotoxicitate pentru liniile celulare cultivate *in vitro* în absența citoB (35) (36) (37) (38) și poate fi considerat drept un parametru suplimentar util.

În orice caz, numărul de celule înainte de tratare trebuie să fie același pentru culturile tratate ca pentru cele martor negativ.

În timp ce RICC (și anume, numărul de celule în culturile tratate/numărul de celule în culturile martor) a fost utilizată ca parametru de citotoxicitate în trecut, aceasta nu mai este recomandată deoarece poate subestima citotoxicitatea.

În cazul în care se utilizează sisteme de examinare automate, de exemplu, citometria de flux, citometre cu scanare laser sau analiza imaginilor, numărul de celule în formula poate fi înlocuit cu numărul de nuclee.

În culturile martor negative, dublarea populației sau indicele de replicare trebuie să fie compatibil cu cerința de prelevare a celulelor după tratament, după un timp echivalent cu aproximativ 1,5-2,0 cicluri celulare normale.”

(15) În partea B, se adaugă următoarele capitole:

„B.59 Sensibilizarea cutanată *in chemico*: Testul reactivității directe a peptidelor (DPRA)

INTRODUCERE

Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 442 (2015). O substanță sensibilizantă pentru piele înseamnă o substanță care conduce la o reacție alergică în urma contactului cu pielea, astfel cum este definit în Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU) (1) și în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ⁽¹⁾. Această metodă de testare furnizează o procedură *in chemico* (Testul reactivității directe a peptidelor – DPRA) care urmează să fie utilizată pentru susținerea diferențierii între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante în conformitate cu GHS al ONU și Regulamentul CLP.

Există un acord general cu privire la principalele evenimente biologice care stau la baza sensibilizării cutanate. Cunoștințele existente cu privire la mecanismele biologice și chimice asociate cu sensibilizarea cutanată au fost sintetizate sub forma unui parcurs al răspunsurilor adverse (Adverse Outcome Pathway – AOP) (2), de la evenimentul declanșator molecular, prin evenimentele intermediare până la efectele adverse, și anume dermatita alergică de contact la oameni sau hipersensibilitate de contact la rozătoare. În cadrul AOP a sensibilizării cutanate, evenimentul declanșator molecular este reprezentat de legarea covalentă a substanțelor electrofile de centrele nucleofile din proteinele din piele.

Evaluarea sensibilizării cutanate a implicat, în general, utilizarea de animale de laborator. Metodele clasice bazate pe cobai, testul de maximizare Magnusson și Kligman (GMPT), testul Buehler [(MT B.6 (3))] studiază atât fazele de inducție, cât și cele de reacție de hipersensibilitate a sensibilizării cutanate. Un test pe murini, testul local asupra ganglionilor limfatici [LLNA, MT B.42 (4)] și cele două variante ale sale non-radioactive, LLNA: Da [MT B.50 (5)] și LLNA: BrdU-ELISA [MT B.51 (6)], care toate evaluează în mod exclusiv reacția de inducție, au beneficiat, de asemenea, de acceptare, întrucât acestea oferă un avantaj față de testele pe cobai din punct de vedere al bunăstării animalelor și o măsurare obiectivă a fazei de inducție a sensibilizării cutanate.

Mai recent, metode de testare pe bază mecanică *in chemico* și *in vitro* au fost considerate valabile din punct de vedere științific pentru evaluarea pericolelor de sensibilizare cutanată ale substanțelor chimice. Cu toate acestea, vor fi necesare combinații de metode care nu se bazează pe animale (*in silico*, *in vitro*, *in chemico*) în cadrul strategiilor integrate de testare și evaluare (Integrated Approaches to Testing and Assessment – IATA) pentru a putea înlocui complet testele pe animale utilizate în prezent, având în vedere gradul restrâns de acoperire automată al AOP al fiecărei metode de testare care nu implică animale disponibilă în prezent (2) (7).

⁽¹⁾ Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353, 31.12.2008, p. 1.

DPRA este propus pentru a aborda evenimentul declanșator molecular al AOP al sensibilizării cutanate, și anume reactivitatea proteinelor, prin cuantificarea reactivității substanțelor chimice testate față de peptidele model sintetice care conțin fie lizină, fie cisteină (8). Valorile depleției procentului de peptidă cisteină și lizină sunt utilizate ulterior pentru a clasifica o substanță în una dintre cele patru categorii de reactivitate pentru sprijinirea diferențierii între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante (9).

DPRA a fost evaluat într-un studiu principal de validare efectuat într-un laborator de referință al Uniunii Europene pentru metode alternative la testare pe animale (EURL ECVAM) și o revizuire independentă inter pares de către Comitetul științific consultativ (ESAC) din cadrul EURL ECVAM și a fost considerat valabil din punct de vedere științific (10) pentru a fi utilizat ca parte a unei IATA pentru a sprijini diferențierea între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante, în scopul clasificării și etichetării pericolelor. Exemple privind utilizarea datelor DPRA în combinație cu alte informații sunt raportate în referințe bibliografice (11) (12) (13) (14).

Definițiile sunt prevăzute în apendicele I.

CONSIDERAȚII INIȚIALE, APLICABILITATE ȘI LIMITĂRI

Corelația reactivității proteinelor cu potențialul de sensibilizare cutanată este bine stabilită (15) (16) (17). Cu toate acestea, întrucât legarea proteinelor reprezintă doar un eveniment cheie, evenimentul declanșator molecular al AOP al sensibilizării cutanate, informațiile cu privire la reactivitatea proteinelor obținute cu metode de testare și metode care nu fac recurs la testări ar putea să nu fie suficiente în sine pentru a concluziona cu privire la absența potențialului de sensibilizare cutanată al substanțelor chimice. Prin urmare, datele obținute prin această metodă de testare se iau în considerare în contextul unor abordări integrate precum IATA, acestea fiind combinate cu alte informații suplimentare, de exemplu obținute din testele *in vitro* care abordează alte evenimente importante ale AOP al sensibilizării cutanate, precum și prin metode care nu fac recurs la testări inclusiv extrapolări ale datelor referitoare la substanțe chimice analoge.

Această metodă de testare poate fi utilizată, în combinație cu alte informații suplimentare, pentru a sprijini diferențierea între substanțele sensibilizante pentru piele (și anume, categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și cele nesensibilizante în contextul IATA. Această metodă de testare nu poate fi utilizată în mod independent, nici pentru a subcategoriza substanțele sensibilizante pentru piele în subcategoriile 1A și 1B, astfel cum sunt definite prin GHS al ONU/Regulamentul CLP, nici pentru a se prevedea potența pentru deciziile în materie de evaluare a siguranței. Cu toate acestea, în funcție de cadrul de reglementare, un rezultat pozitiv obținut prin intermediul DPRA poate fi utilizat în mod independent pentru a clasifica o substanță chimică în categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP.

Metoda de testare a DPRA s-a dovedit a fi transferabilă către laboratoare cu experiență în analiza prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC). Nivelul de reproductibilitate al estimărilor care pot fi preconizate în urma metodei de testare este de ordinul a 85 % în cadrul laboratoarelor și 80 % între laboratoare (10). Rezultatele obținute în cadrul studiului de validare (18) și în studiile publicate (19) indică faptul că, în ansamblu, precizia DPRA la diferențierea substanțelor sensibilizante (și anume, cat. 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) de cele nesensibilizante este de 80 % (N = 157) cu o sensibilitate de 80 % (88/109) și specificitate de 77 % (37/48) în raport cu rezultatele LLNA. DPRA are mai multe șanse să subestimeze substanțele chimice care prezintă un nivel scăzut până la moderat de potență de sensibilizare cutanată (și anume, subcategoria 1B din GHS al ONU/Regulamentul CLP) față de substanțele chimice care prezintă un grad ridicat de potență de sensibilizare cutanată (și anume, subcategoria 1A din GHS al ONU/Regulamentul CLP) (18) (19). Cu toate acestea, valorile de precizie furnizate în prezentul document pentru DPRA ca metodă de testare de sine stătătoare sunt doar orientative, întrucât metoda de testare se ia în considerare în combinație cu alte surse de informații în contextul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la punctul 9 de mai sus. În plus, la evaluarea metodelor care nu se bazează pe animale pentru sensibilizarea cutanată, se ia în vedere faptul că testul LLNA, precum și alte teste pe animale pot să nu reflecte pe deplin situația speciei de interes, și anume oamenii. Pe baza informațiilor generale disponibile, DPRA s-a dovedit a fi aplicabil substanțelor chimice de testat care acoperă o varietate de grupe organice funcționale, mecanisme de reacție, potență de sensibilizare cutanată (astfel cum a fost determinat în studii *in vivo*), precum și proprietăți fizico-chimice ale substanței chimice (8) (9) (10) (19). Coroborate, aceste informații indică utilitatea DPRA la contribuirea la identificarea pericolelor de sensibilizare cutanată.

Termenul „substanță chimică de testat” este utilizat în această metodă de testare pentru a se referi la ceea ce este supus testării și nu are legătură cu aplicabilitatea DPRA la testarea substanțelor și/sau a amestecurilor. Această metodă de testare nu se aplică testării compușilor metalici, întrucât aceștia sunt cunoscuți că reacționează cu proteinele cu alte mecanisme decât legătura covalentă. O substanță chimică de testat este solubilă în apă într-un solvent adecvat cu o concentrație finală de 100 mM (a se vedea punctul 18). Cu toate acestea, substanțele chimice de testat care nu sunt solubile la această concentrație pot fi testate în continuare la concentrații solubile mai mici. Într-un astfel de caz, un rezultat pozitiv ar putea fi utilizat în continuare pentru a sprijini identificarea substanței chimice de testat ca sensibilizant al pielii, dar nu se poate ajunge la nicio concluzie definitivă privind lipsa de reactivitate dintr-un rezultat negativ. În prezent, sunt disponibile puține informații cu privire la aplicabilitatea DPRA la amestecuri cu compoziție cunoscută (18) (19). Cu toate acestea, DPRA este considerat a fi aplicabil din punct de vedere tehnic pentru testarea substanțelor și amestecurilor multicomponente cu compoziție cunoscută (a se vedea punctul 18). Înainte de utilizarea acestei metode de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare specific, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate furniza rezultate adecvate pentru scopul respectiv. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului. Actualul model predictiv nu pot fi utilizat pentru amestecuri complexe cu compoziție necunoscută sau pentru substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produse de reacție complexă sau materiale biologice (și anume, substanțe UVCB) din cauza raportului molar definit de substanță chimică de testat și peptidă. În acest scop, este necesară dezvoltarea unui nou model predictiv, bazat pe o abordare gravimetrică. În cazul în care poate fi demonstrată existența unor dovezi privind neaplicabilitatea metodei de testare la alte categorii specifice de substanțe chimice, metoda de testare nu trebuie să fie utilizată la respectivele categorii specifice de substanțe chimice.

Această metodă de testare este o metodă *in chemico* care nu cuprinde un sistem metabolic. Substanțele chimice care necesită bioactivare enzimatică pentru a-și exercita potențialul de sensibilizare cutanată (și anume, prohaptene) nu pot fi detectate prin metoda de testare. Substanțe chimice care devin sensibilizante în urma transformării abiotice (și anume, prehaptene) sunt raportate în unele cazuri a fi corect identificate prin metoda de testare (18). Având în vedere considerațiile de mai sus, rezultatele negative obținute prin metoda de testare se interpretează în contextul limitelor menționate și în legătură cu alte surse de informații în cadrul unei IATA. Substanțele chimice de testat care nu se leagă covalent la peptidă, dar își promovează oxidarea (și anume, dimerizarea cisteinei) ar putea conduce la o posibilă supraestimare a depleției de peptidă, având ca rezultat posibile estimări fals pozitive și/sau atribuirea unei clase de reactivitate mai mare (a se vedea punctele 29 și 30).

Astfel cum a fost descris, DPRA sprijină diferențierea între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante. Cu toate acestea, acesta poate, de asemenea, să contribuie la evaluarea potenței de sensibilizare (11) atunci când este utilizat în abordări integrate precum IATA. Sunt însă necesare lucrări suplimentare, de preferință pe baza datelor cu privire la oameni, pentru a determina modalitatea în care rezultatele DPRA pot informa evaluarea potenței.

PRINCIPIUL TESTULUI

DPRA este o metodă *in chemico* care cuantifică concentrația de peptidă cisteină sau lizină rămasă după incubarea timp de 24 de ore cu substanța chimică de testat la $25 \pm 2,5$ °C. Peptidele sintetice conțin fenilalanină pentru a asista la detecție. Se măsoară concentrația relativă de peptidă prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu eluție în gradient și detecție UV la 220 nm. Valorile depleției procentului de peptidă cisteină și lizină sunt apoi calculate și utilizate într-un model predictiv (a se vedea punctul 29), care permite repartizarea substanței chimice de testat în una dintre cele patru clase de reactivitate utilizate pentru susținerea diferențierii între substanțele sensibilizante de cele nesensibilizante.

Înainte de utilizarea sistematică a metodei descrise în prezenta metodă de testare, laboratoarele trebuie să demonstreze performanțele lor tehnice utilizând cele zece substanțe de verificare menționate în appendicele 2.

PROCEDURĂ

Această metodă de testare se bazează pe protocolul DPRA DB-ALM nr. 154 (20), care reprezintă protocolul utilizat pentru studiul de validare coordonat de EURL ECVAM. Se recomandă utilizarea acestui protocol atunci când se pune în aplicare și se utilizează metoda în laborator. Componentele și procedurile principale pentru DPRA sunt descrise în continuare. În cazul în care se utilizează un alt dispozitiv HPLC, echivalența acestuia cu dispozitivul validat descris în protocol DB-ALM trebuie să fie demonstrată (de exemplu, prin testări ale substanțelor de verificare din appendicele 2).

Pregătirea peptidelor care conțin cisteină sau lizină

Soluțiile mamă de peptide sintetice care conțin cisteină (Ac-RFAACAA-COOH) și lizină (Ac-RFAAKAA-COOH) cu o puritate mai mare de 85 % și de preferință în plaja de valori 90-95 %, sunt proaspăt preparate, chiar înainte de incubarea cu substanța chimică de testat. Concentrația finală de peptidă cisteină trebuie să fie de 0,667 mM în tampon de fosfat cu pH 7,5 în timp ce concentrația finală de peptidă lizină trebuie să fie de 0,667 mM în tampon de acetat de amoniu cu pH 10,2. Secvența de funcționare a HPLC se configurează pentru a menține timpul de analiză HPLC mai puțin de 30 de ore. Pentru dispozitivul HPLC utilizat în studiul de validare și descris în prezenta metodă de testare, într-o singură determinare HPLC pot fi incluse până la 26 de probe de analiză (care includ substanța chimică de testat, martorul pozitiv și numărul corespunzător de martori solvent în funcție de numărul individual de solvenți utilizați în cadrul testului, fiecare testat în triplicat). Toate probele duplicate analizate în aceeași determinare utilizează soluții mamă de peptidă cisteină și lizină identice. Se recomandă testarea loturilor individuale de peptide pentru solubilitate adecvată înainte de utilizarea acestora.

Prepararea substanței chimice de testat

Solubilitatea substanței chimice de testat într-un solvent adecvat se evaluează înainte de efectuarea testului, urmărind procedura descrisă în protocolul DPRA DB-ALM (20). Un solvent adecvat va dizolva substanța chimică de testat complet. Având în vedere faptul că în DPRA substanța chimică de testat se incubează în exces fie cu peptidele cisteină, fie cu cele lizină, inspecția vizuală a formării unei soluții clare este considerată suficientă pentru a stabili dizolvarea substanței chimice de testat (și a tuturor componentelor acesteia în cazul testării unei substanțe multicomponente sau un amestec). Solvenți adecvați sunt acetonitrilul, apă, 1: 1 amestec apă: acetonitril, izopropanol, acetona sau 1: 1 amestec acetona: acetonitril. Se pot utiliza alți solvenți atât timp cât aceștia nu au un impact asupra stabilității peptidei, astfel cum este monitorizată cu martori de referință C (și anume, probe constituite din peptida singură dizolvată în solvent adecvat; a se vedea appendicele 3). Ca o ultimă opțiune, în cazul în care substanța chimică de testat nu este solubilă în oricare dintre acești solvenți, se încearcă solubilizarea în 300 μ l DMSO și se diluează soluția rezultată cu 2700 μ l de acetonitril, iar, în cazul în care substanța chimică de testat nu este solubilă în acest amestec, se încearcă solubilizarea aceleiași cantități de substanță chimică de testat în 1500 μ l de DMSO și se diluează soluția rezultată cu 1500 μ l de acetonitril. Substanța chimică testată se cântărește în prealabil în flacoane de sticlă și se dizolvă imediat înainte de testare într-un solvent adecvat pentru a pregăti o soluție de 100 mM. În cazul amestecurilor și al substanțelor multicomponente cu compoziție cunoscută, se determină o puritate unică din suma proporției componentelor acestora (cu excepția apei) și se determină o masă moleculară unică aparentă prin luarea în considerare a maselor moleculare individuale ale fiecărui component al amestecului (cu excepția apei) și proporțiile lor individuale. Puritatea și greutatea moleculară aparentă rezultate sunt utilizate apoi pentru a calcula cantitatea de substanță chimică de testat necesară pentru a pregăti o soluție de 100 mM. În cazul polimerilor a căror masă moleculară predominantă nu poate fi determinată, se poate lua în considerare masa moleculară a monomerului (sau greutatea moleculară a diversilor monomeri care constituie polimerul) pentru a se prepara o soluție de 100 mM. Cu toate acestea, atunci când se testează amestecuri, substanțe multicomponente sau polimeri cu compoziție cunoscută, se ia în considerare, de asemenea, testarea substanței chimice pure. În cazul substanțelor lichide, substanța chimică pură se testează ca atare, fără nicio diluție în prealabil prin incubarea la raport molar 1:10 și 1:50 cu peptidele cisteină și, respectiv, peptidele lizină. În cazul substanțelor solide, substanța chimică de testat se dizolvă la concentrația maximă solubilă în același solvent utilizat pentru pregătirea soluției aparente de 100 mM. Se testează în continuare ca atare, fără orice diluție suplimentară, prin incubarea la raport 1:10 și 1:50 cu peptidele cisteină și respectiv, peptidele lizină. Rezultatele concordante (reactive sau nereactive) dintre soluția aparentă de 100 mM și substanța chimică pură permit o concluzie definitivă cu privire la rezultat.

Pregătirea martorilor pozitivi, a martorilor de referință și a martorilor de coeluție

Aldehida cinamică (CAS 104-55-2; de puritate alimentară ≥ 95 %) se utilizează ca martor pozitiv (MP) la o concentrație de 100 mM în acetonitril. Pot fi utilizați alți martori pozitivi adecvați, de preferință care să furnizeze valori medii de epuizare, în cazul în care sunt disponibile date anterioare pentru a obține criterii comparabile de acceptare a determinării. În plus, în secvența de determinare HPLC se includ, de asemenea, martori de referință (și anume, probe care conțin doar peptida dizolvată în solventul corespunzător) și aceștia sunt utilizați pentru a verifica caracterul adecvat al sistemului HPLC înainte de analiză (martori de referință A), stabilitatea în timp a martorilor de referință (martori de referință B) și pentru a verifica dacă solventul utilizat pentru a dizolva substanța chimică de testat nu are un impact asupra procentului de depleție de peptidă (martori de referință C) (a se vedea apendicele 3). Martorul de referință corespunzător pentru fiecare substanță chimică este utilizat pentru a calcula procentul de depleție de peptidă pentru substanța chimică respectivă (a se vedea punctul 26). În plus, un martor de coeluție constituit doar din substanța chimică de testat, pentru fiecare dintre substanțele chimice de testat analizate se include în secvența de determinare pentru a detecta posibila coeluție a substanței chimice de testat fie cu peptida lizină, fie cu peptida cisteină.

Incubarea substanței chimice de testat cu soluțiile de peptidă lizină și cisteină

Soluțiile de peptidă cisteină și lizină se incubează în flacoane de sticlă cu autoprelevare de probe cu substanța chimică de testat la raport 1:10 și, respectiv, 1:50. Dacă se observă un precipitat imediat după adăugarea soluției de substanță chimică de testat în soluția de peptidă din cauza gradului redus de solubilitate în apă a substanței chimice de testat, atunci nu se poate cunoaște în mod sigur cantitatea de substanță chimică de testat rămasă în soluție pentru a reacționa cu peptida. Prin urmare, într-un astfel de caz, un rezultat pozitiv ar putea fi încă utilizat, dar un rezultat negativ este incert și se interpretează cu prudență [a se vedea, de asemenea, prevederile de la punctul 11 pentru testarea substanțelor chimice care nu sunt solubile până la o concentrație de 100 mM]. Soluția de reacție se lasă la întuneric, la $25 \pm 2,5$ °C, timp de 24 ± 2 ore, înainte de a efectua analiza HPLC. Fiecare substanță chimică de testat se analizează în triplicat pentru ambele peptide. Probele se inspectează vizual înainte de analiza HPLC. În cazul în care se observă un precipitat sau o separare a fazelor, probele se pot supune centrifugării la viteză redusă (100-400xg) pentru a forța precipitatul la fundul flaconului ca măsură de precauție, deoarece cantitățile mari de precipitat pot bloca tuburile sau coloanele HPLC. În cazul în care se observă un precipitat sau o separare a fazelor după perioada de incubare, depleția peptidei ar putea fi subestimată, iar o concluzie privind lipsa de reactivitate nu poate fi stabilită cu suficientă încredere în cazul unui rezultat negativ.

Pregătirea curbei standard de etalonare HPLC

Se generează o curbă de etalonare standard atât pentru peptida cisteină, cât și pentru cea lizină. Standardele de peptide se prepară într-o soluție de 20 % sau 25 % acetonitril: se tamponează utilizând soluție tampon fosfată (pH 7,5) pentru peptida cisteină și soluția tampon de acetat de amoniu (pH 10,2) pentru peptida lizină. Utilizând standarde de diluție în serie a soluției mamă de peptidă (0,667 mM), se prepară 6 soluții de calibrare pentru a acoperi plaja de valori de la 0,534 până la 0,0167 mM. Un martor al tamponului de diluție se include, de asemenea, în curba standard de etalonare. Curbele de etalonare corespunzătoare trebuie să aibă $r^2 > 0,99$.

Pregătirea și analiza HPLC

Caracterul adecvat al sistemului HPLC se verifică înainte de efectuarea analizei. Depleția de peptidă este monitorizată prin HPLC cuplată cu un detector UV (detector cu grup de fotodiode sau detector cu lungime de undă fixă de absorbanță cu un semnal de 220 nm). Coloana corespunzătoare este instalată în sistemul HPLC. Dispozitivul HPLC descris în protocoalele validate utilizează, de preferință, o coloană Zorbax SB-C-18 2,1 mm x 100 mm x 3,5 micrometri. Cu această coloană HPLC cu fază inversă, întregul sistem se echilibrează la 30 °C cu faza A 50 % [0,1 % (v/v) acid trifloroacetic în apă] și faza B 50 % [0,085 % (v/v) acid trifloroacetic în acetonitril] timp

de cel puțin 2 ore înainte de funcționare. Analiza HPLC se efectuează utilizând un debit de 0,35 ml/min și un gradient liniar de la 10 % până la 25 % acetonitril peste 10 minute, urmat de o creștere rapidă la 90 % acetonitril pentru a îndepărta alte materiale. Se injectează volume egale din fiecare standard, probă și martor. Coloana se reechilibrează conform condițiilor inițiale timp de 7 minute între injectări. În cazul în care se utilizează o coloană HPLC cu fază inversă diferită, parametrii descriși mai sus ar putea necesita modificări pentru a garanta un nivel adecvat de eluare și integrare a peptidelor cisteină și lizină, inclusiv volumul de injecție, care poate varia în funcție de sistemul utilizat (în mod obișnuit, în plaja de valori 3-10 μl). În cazul în care se utilizează un alt dispozitiv HPLC, este important să se demonstrează echivalența acestuia cu dispozitivul validat descris mai sus (de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 2). Absorbanța se monitorizează la 220 nm. În cazul în care se utilizează un detector cu grup de fotodiode, se înregistrează, de asemenea, absorbanța la 258 nm. Se remarcă faptul că unele administrări de acetonitril ar putea avea un impact negativ asupra stabilității peptidei și acest lucru trebuie evaluat atunci când se utilizează un lot nou de acetonitril. Raportul dintre aria picului 220 și aria picului 258 poate fi utilizat ca indicator al coeluției. Pentru fiecare probă, un raport care se încadrează în plaja de valori 90 % < raportul mediu ⁽¹⁾ al ariei probelor martor < 100 % ar furniza un indicator puternic conform căruia coeluția nu a avut loc.

Pot exista substanțe chimice de testat care ar putea promova oxidarea peptidei cisteină. Picul peptidei cisteină dimerizată poate fi monitorizat vizual. În cazul în care dimerizarea pare să fi avut loc, acest lucru se menționează întrucât procentul de depleție de peptidă poate fi supraestimat, ceea ce conduce la estimări fals pozitive și/sau încadrarea într-o clasă de reactivitate mai ridicată (a se vedea punctele 29 și 30).

Analiza HPLC pentru peptidele cisteină și lizină poate fi efectuată simultan (în cazul în care sunt disponibile două sisteme HPLC) sau în zile diferite. În cazul în care analiza se realizează în zile diferite, atunci toate soluțiile de substanță chimică de testat trebuie să fie proaspăt pregătite pentru ambele teste, în fiecare zi. Analiza se planifică astfel încât să se asigure că injectarea primei probe începe cu 22 până la 26 de ore după amestecul substanței chimice de testat cu soluția de peptidă. Secvența de determinare a HPLC se configurează pentru a menține timpul de analiză HPLC sub 30 de ore. Pentru dispozitivul HPLC utilizat în studiul de validare și descris în prezenta metodă de testare, într-o singură determinare HPLC pot fi incluse până la 26 de probe de analiză (a se vedea, de asemenea, punctul 17). Un exemplu de secvență de analiză HPLC este prevăzut în apendicele 3.

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea datelor

Concentrația de peptidă cisteină sau lizină se determină fotometric la 220 nm în fiecare probă prin măsurarea ariei picului [aria de sub curbă (ASC)] pentru picurile corespunzătoare și prin calcularea concentrației de peptidă utilizând curba de etalonare liniară obținută din standarde.

Procentul de depleție de peptidă se determină din fiecare probă prin măsurarea ariei picului și împărțirea acesteia la aria medie a picului martorilor de referință C relevanți (a se vedea apendicele 3) conform formulei descrise mai jos.

$$\text{Procentul de depleție de peptidă} = \left[1 - \left(\frac{\text{Aria picului de peptidă în injecția replică}}{\text{Media ariei picului de peptidă în martorii de referință}} \right) \right] \times 100$$

Criterii de acceptare

Următoarele criterii trebuie îndeplinite pentru ca o determinare să fie considerată valabilă:

- curba de etalonare standard trebuie să aibă $r^2 > 0,99$;

⁽¹⁾ Prin mediu se înțelege media aritmetică în întregul document.

- b) valoarea medie a procentului de depleție de peptidă a celor trei duplicate pentru aldehida cinamică martor pozitiv trebuie să fie cuprins între 60,8 % și 100 % pentru peptida cisteină și între 40,2 % și 69,0 % pentru peptida lizină, iar deviația standard maximă (DS) pentru duplicatele martor pozitiv trebuie să fie <14,9 % pentru procentul de depleție de cisteină și <11,6 % pentru procentul de depleție de lizină și
- c) concentrația medie de peptidă a martorilor de referință A trebuie să fie de $0,50 \pm 0,05$ mM și coeficientul de variație (CV) a ariile picurilor peptidei celor nouă martori de referință B și C în acetonitril trebuie să fie < 15,0 %.

În cazul în care unul sau mai multe dintre aceste criterii nu este îndeplinit, determinarea se repetă.

Următoarele criterii trebuie îndeplinite pentru ca rezultatele unei substanțe chimice de testat să fie considerate valabile:

- a) deviația standard maximă pentru probele duplicate ale substanței chimice de testat trebuie să fie <14,9 % pentru procentul de depleție de cisteină și <11,6 % pentru procentul de depleție de lizină,
- b) concentrația medie de peptidă a celor trei martori de referință C în solvent adecvat trebuie să fie de $0,50 \pm 0,05$ nM. În cazul în care aceste criterii nu sunt îndeplinite, datele se resping și determinarea se repetă pentru respectiva substanță chimică de testat.

Model predictiv

Valoarea medie a procentului de depleție de cisteină și lizină se calculează pentru fiecare substanță chimică de testat. Depleția negativă este considerată ca fiind „0” atunci când se calculează valoarea medie. Prin utilizarea modelului predictiv cisteină 1: 10/lizină 1: 50 prezentat în tabelul 1, pragul de 6,38 % de depleție medie de peptidă se utilizează pentru a sprijini diferențierea între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante în cadrul unei IATA. Aplicarea modelului predictiv pentru încadrarea unei substanțe chimice de testat într-o clasă de reactivitate (de exemplu, reactivitate redusă, moderată și ridicată) se poate dovedi utilă pentru a furniza informații cu privire la evaluarea potenței în cadrul unei IATA.

Tabelul 1

Model predictiv cisteină 1:10/lizină 1:50 ⁽¹⁾

Valoarea medie a % de depleție de cisteină și lizină	Clasa de reactivitate	Estimare DPRA ⁽²⁾
0 % ≤ % depleție medie ≤ 6,38 %	Reactivitate zero sau minimă	Negativă
6,38 % < % depleție medie ≤ 22,62 %	Reactivitate scăzută	Pozitivă
22,62 % < % depleție medie ≤ 42,47 %	Reactivitate moderată	
42,47 % < % depleție medie ≤ 100 %	Reactivitate ridicată	

⁽¹⁾ Cifrele se referă la valorile prag generate din punct de vedere statistic și nu sunt legate de gradul de precizie al metodei de măsurare.

⁽²⁾ O estimare DPRA se ia în considerare în cadrul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la punctele 9 și 12.

Pot exista cazuri în care substanța chimică de testat (substanța sau unul sau mai multe dintre componentele unei substanțe multicomponentă sau un amestec) absoarbe în mod semnificativ la 220 nm și are același timp de retenție ca peptida (coeluție). Coeluția poate fi soluționată printr-o ușoară ajustare a dispozitivului HPLC pentru a separa în continuare timpul de eluție al substanței chimice de testat și al peptidei. În cazul în care se utilizează alt dispozitiv HPLC pentru a încerca soluționarea coeluției, este necesară demonstrarea echivalenței acestuia cu dispozitivul validat (de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 2). Atunci când se produce coeluția, picul peptidei nu poate fi integrat și calcularea procentului de depleție a peptidei nu este posibilă. În cazul în care coeluția unor astfel de substanțe chimice de testat se produce cu peptidele cisteină și lizină, analiza se raportează ca „neconcludentă”. În cazurile în care coeluția se produce numai cu peptida lizină, se poate utiliza modelul predictiv cisteină 1:10 raportat în tabelul 2.

Tabelul 2

Model predictiv cisteină 1:10 ⁽¹⁾

% de depleție de cisteină (cis)	Clasa de reactivitate	Estimare DPRA ⁽²⁾
0 % ≤ % depleție cis ≤ 13,89 %	Reactivitatea zero sau minimă	Negativă
13,89 % < % depleție cis ≤ 23,09 %	Reactivitatea scăzută	Pozitivă
23,09 % < % depleție cis ≤ 98,24 %	Reactivitatea moderată	
98,24 % < % depleție cis ≤ 100 %	Reactivitate ridicată	

⁽¹⁾ Cifrele se referă la valorile prag generate din punct de vedere statistic și nu sunt legate de gradul de precizie al metodei de măsurare.

⁽²⁾ O estimare DPRA se ia în considerare în cadrul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la punctele 9 și 12.

Ar putea exista alte cazuri în care suprapunerea în ceea ce privește timpul de retenție dintre substanța chimică de testat și oricare dintre peptide este incomplet. În astfel de cazuri, valorile procentului de depleție de peptidă pot fi estimate și utilizate în modelul predictiv cisteină 1:10/lizină 1:50, cu toate că încadrarea substanței chimice de testat într-o clasă de reactivitate nu poate fi efectuată cu precizie.

O singură analiză HPLC pentru ambele peptide cisteină și lizină este suficientă pentru o substanță chimică de testat atunci când rezultatul este fără echivoc. Cu toate acestea, în cazul unor rezultate apropiate de pragul utilizat pentru a se face diferența între rezultatele pozitive și negative (și anume, rezultate limită) pot fi necesare teste suplimentare. În situații în care procentul mediu de depleție se încadrează în intervalul 3 %- 10 % pentru modelul predictiv cisteină 1:10/lizină 1:50 sau procentul de depleție de cisteină se încadrează în plaja de valori 9 %- 17 % pentru modelul predictiv cisteină 1:10, se ia în considerare o a doua determinare, precum și o a treia, în cazul unor rezultate discordante între primele două determinări.

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat

— Substanță monocomponentă

— Identificare chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

- Aspectul fizic, solubilitatea în apă, greutatea moleculară, precum și proprietățile fizicochimice relevante suplimentare, în măsura în care sunt disponibile;
 - Purity, identity chemical of impurities, as far as is appropriate and feasible from a practical point of view etc.;
 - Treatment before the test, if the case (for example, heating, grinding);
 - Concentration (concentrations) tested(e);
 - Conditions of storage and stability, in the measure in which it is possible.
- Substanță multicomponentă, UVCB și amestec:
- Characterization, in the measure in which it is possible, for example, identity chemical (as seen above), purity, quantitative appearance and physico-chemical properties (as seen above) of components, in the measure in which it is possible;
 - Aspectul fizic, solubilitatea în apă și proprietățile fizico-chimice relevante suplimentare, în măsura în care este posibil;
 - Molecular mass or apparent molecular mass in the case of mixtures/polymers with known composition or other relevant information for the study;
 - Treatment before the test, if the case (for example, heating, grinding);
 - Concentration (concentrations) tested(e);
 - Conditions of storage and stability, in the measure in which it is possible.

Martori

- Martor pozitiv
- Identification chemical, as the name (names) IUPAC or CAS, number (numbers) SMILES or code InChI, structural formula and/or other identifiers;
 - Aspectul fizic, solubilitatea în apă, masa moleculară, precum și proprietățile fizico-chimice relevante suplimentare, în măsura în care sunt disponibile;
 - Purity, identity chemical of impurities, as far as is appropriate and feasible from a practical point of view etc.;
 - Treatment before the test, if the case (for example, heating, grinding);
 - Concentration (concentrations) tested(e);
 - Conditions of storage and stability, in the measure in which it is possible;
 - Reference to previous results of positive witnesses that demonstrate adequate criteria of acceptance of determination, if the case.
- Solvent/vehicul
- Solvent/vehicle used and report of components of this, if the case;
 - Identification (identifications) chemical(e), as the name (names) IUPAC or CAS, number (numbers) CAS and/or other identifiers;
 - Purity, identity chemical of impurities, as far as is appropriate and feasible from a practical point of view etc.;
 - Physical aspect, molecular mass and physico-chemical properties relevant supplementary in the case in which it is used other solvents/vehicles than those mentioned in the test method and in the measure in which it is possible;
 - Conditions of storage and stability, in the measure in which it is possible;

- Justificarea alegerii solventului pentru fiecare substanță chimică de testat;
- Pentru acetonitril, rezultatele testului de impact asupra stabilității peptidice.

Pregătirea peptidelor, a matorului pozitiv și a substanței chimice de testat

- Caracterizarea soluțiilor de peptidă (furnizor, lot, greutatea exactă a peptidei, volumul de soluție mamă adăugat);
- Caracterizarea soluției mator pozitiv (greutatea exactă a substanței mator pozitiv, volumul de soluție de testat adăugat);
- Caracterizarea soluțiilor de substanță chimică de testat (greutatea exactă a substanței chimice de testat, volumul de soluție de testat adăugat).

Reglajele instrumentelor și analiza HPLC

- Tipul de instrument HPLC, coloane HPLC și de protecție, detector, dispozitiv cu prelevare automată a probelor;
- Parametrii relevanți pentru analiza HPLC, precum temperatura coloanei, volumele de injecție, debitul și gradientul.

Adecvarea sistemului

- Aria picului peptidei la 220 nm a fiecărui replicat standard și mator de referință A;
- Curbă de etalonare liniară reprezentată grafic și r^2 raportată;
- Concentrația de peptidă a fiecărui replicat de mator de referință A;
- Concentrația medie de peptidă (mM) a celor trei matori de referință, DS și CV;
- Concentrația de peptidă a matorilor de referință A și C.

Secvența de analiză

- Pentru matorii de referință:
 - Aria picului de peptidă la 220 nm a fiecărui replicat B și C;
 - Aria medie a picului de peptidă la 220 nm a celor nouă matori de referință B și C în acetonitril, DS și CV (pentru stabilitatea matorilor de referință pe timpul analizei);
 - Pentru fiecare solvent utilizat, aria medie a picului de peptidă la 220 nm a celor trei matori de referință C corespunzători (pentru calcularea procentului de depleție de peptidă);
 - Pentru fiecare solvent utilizat, concentrația de peptidă (mM) a celor trei matori de referință corespunzători C;
 - Pentru fiecare solvent utilizat, concentrația medie de peptidă (mM) a celor trei matori de referință corespunzători C, DS și CV.
- Pentru matorul pozitiv:
 - Aria picului de peptidă la 220 nm a fiecărei replici;
 - Procentul de depleție de peptidă a fiecărei replici;
 - Procentul mediu de depleție a celor trei replici, DS și CV.
- Pentru fiecare substanță chimică de testat:
 - Aspectul precipitatului în amestecul de reacție la sfârșitul perioadei de incubare, dacă se observă. Dacă precipitatul a fost resolubilizat sau centrifugat;

- Prezența coeluției;
- O descriere a oricăror alte observații relevante, dacă este cazul;
- Aria picului de peptidă la 220 nm a fiecărei replici;
- Procentul de depleție de peptidă a fiecărei replici;
- Procentul mediu de depleție de peptidă a celor trei replici, DS și CV;
- Valorile medii a procentului de depleție de cisteină și depleție de lizină;
- Modelul predictiv utilizat și estimarea DPRA.

Verificarea competenței

- Dacă este cazul, procedura utilizată pentru a demonstra performanțele de laborator la efectuarea metodei de testare (de exemplu, prin testarea unor substanțe de verificare) sau pentru a demonstra performanța de reproductibilitate a metodei de testare în timp.

Discutarea rezultatelor

- Discutarea rezultatelor obținute cu ajutorul metodei de testare DPRA;
- Discutarea rezultatelor metodei de testare în contextul unei IATA, în cazul în care sunt disponibile alte informații relevante.

Concluzie

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Disponibil la: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Partea 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.
- (3) Capitolul B.6 din prezenta anexă: Sensibilizare cutanată.
- (4) Capitolul B.42 din prezenta anexă: Testul local pe ganglioni limfatici
- (5) Capitolul B.50 din prezenta anexă: Sensibilizare dermică: Testul local pe ganglioni limfatici: DA.
- (6) Capitolul B.51 din prezenta anexă: Sensibilizare dermică: Testul local pe ganglioni limfatici: BrdU-ELISA
- (7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367-485.
- (8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332-343.
- (9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97:417-427.
- (10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Disponibil la: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra>
- (11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

- (12) Bauch *et al.* (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 63: 489-504.
- (13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. *Toxicology in vitro* 27:609-618.
- (14) Ball *et al.* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 60:389-400.
- (15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *Journal of Experimental Medicine* 64:625-639.
- (16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.
- (17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.
- (18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74p. Disponibil la: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra
- (19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.
- (20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17p. Disponibil la: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (21) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- (22) FDA (Food and Drug Administration) (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22p. Disponibil la: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf – 138
- (23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
-

Apendicele 1

DEFINIȚII

Precizie: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele „relevanță” acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul de „concordanță” pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (21).

AOP (parcursul răspunsurilor adverse): O serie de evenimente din structura chimică a unei substanțe chimice țintă sau un grup de substanțe chimice similare de la evenimentul declanșator molecular până la un răspuns *in vivo* de interes (2).

Curba de etalonare: Relația dintre valoarea experimentală de răspuns și concentrația analitică (denumită, de asemenea, *curbă standard*) a unei substanțe cunoscute.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Coeficient de variație: O măsură a variabilității care se calculează pentru un grup de date replicate prin împărțirea deviației standard la valoarea medie. Aceasta poate fi multiplicată cu 100 pentru exprimarea în procent.

Pericol: Proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, un sistem sau o (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

IATA (strategie integrată pentru testare și evaluare): O abordare structurată utilizată pentru identificarea pericolelor (potențial), caracterizării pericolelor (potență) și/sau evaluarea siguranței (potențial/potență și expunere) pentru o substanță chimică sau un grup de substanțe chimice, care se integrează din punct de vedere strategic și măsoară toate datele relevante pentru a furniza informații cu privire la decizii de reglementare în ceea ce privește potențialele pericole și/sau riscuri și/sau necesitatea unor teste suplimentare specifice și, prin urmare, minime.

Eveniment declanșator molecular: Perturbație provocată de o substanță chimică unui sistem biologic la nivel molecular, identificată ca fiind evenimentul inițiator al evoluției răspunsurilor adverse.

Amestec: Un amestec sau o soluție compusă din două sau mai multe substanțe în care acestea reacționează (1).

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în măsură de cel puțin 80 % (g/g).

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care mai mult de un singur component principal este prezent într-o concentrație ≥ 10 % (g/g) și < 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

Martor pozitiv: O probă replică ce conține toate componentele sistemului de testare și care a fost tratată cu o substanță cunoscută pentru faptul că induce o reacție pozitivă. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu trebuie să fie excesiv de mare.

Martor de referință: O probă netratată care conține toate componentele unui sistem testat, inclusiv solventul sau vehiculul care este analizat împreună cu substanța chimică de testat și cu alte probe martor pentru a stabili nivelul de bază pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată în același solvent sau vehicul. Atunci când este testată în paralel cu un martor negativ, această probă indică, de asemenea, dacă solventul sau vehiculul interacționează cu sistemul testat.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul studiat și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop specific. Acesta reprezintă măsura în care testul măsoară și prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include luarea în considerare a acurateței (conformității) unei metode de testare (21).

Fiabilitate: Măsurile în care o metodă de testare poate fi efectuată în mod reproductibil, în același laborator sau în laboratoare diferite în timp, atunci când este efectuată utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau între laboratoare și a repetabilității în același laborator (21).

Reproductibilitate: Acordul dintre rezultatele obținute în urma testării aceleiași substanțe chimice, utilizând același protocol de testare (a se vedea fiabilitatea) (21).

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect prin metoda de testare. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (21).

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect prin metoda de testare. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (21).

Substanță: Elemente chimice și compuși lor în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a menține stabilitatea produsului și orice impuritate rezultată din procesul utilizat, dar cu excepția oricărui solvent care poate fi separat fără a influența stabilitatea substanței sau fără a schimba compoziția acesteia (1).

Adecvarea sistemului: Determinarea performanței instrumentului (de exemplu, sensibilitatea) prin analiza unui standard de referință înainte de trece la lotul analitic (22).

Substanță chimică de testat: Termenul „substanță chimică de testat” se utilizează pentru a se face referință la ceea ce este testat.

Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pericole pentru sănătate și pericole pentru mediu și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, de exemplu pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de siguranță pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului (1).

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produse de reacție complexă sau materiale biologice.

Metoda de testare valabilă: O metodă de testare considerată a avea suficientă relevanță și fiabilitate pentru un scop specific și care se bazează pe principii solide din punct de vedere științific. O metodă de testare nu este niciodată valabilă într-un sens absolut, ci doar în legătură cu un scop definit (21).

Apendicele 2

SUBSTANȚE DE VERIFICARE

Sensibilizare cutanată *in chemico*: Testul reactivității directe a peptidelor

Înainte de utilizarea sistematică a acestei metode de testare, laboratoarele trebuie să demonstreze performanțele tehnice proprii prin obținerea în mod corect a estimărilor DPRA preconizate pentru cele 10 substanțe de verificare recomandate în tabelul 1 și prin obținerea valorilor de depleție de cisteină și lizină care se încadrează în plajele de valori de referință respective pentru 8 din cele 10 substanțe de verificare pentru fiecare peptidă. Substanțele de verificare au fost selectate pentru a reprezenta plaja de valori a rezultatelor pentru pericolele de sensibilizare cutanată. Alte criterii de selecție au fost disponibilitatea în comerț, disponibilitatea de date de referință *in vivo* de calitate superioară și de date *in vitro* de calitate superioară generate cu DPRA și faptul că acestea au fost utilizate în studiul de validare coordonat de EURL ECVAM pentru a demonstra punerea în aplicare cu succes a metodei de testare în laboratoarele participante la studiu.

Tabelul 1

Substanțe de verificare recomandate pentru a demonstra performanțele tehnice prin testul reactivității directe a peptidelor

Substanțe de verificare	NR. CAS	Starea fizică	Estimare <i>in vivo</i> (¹)	Estimare DPRA (²)	Intervalul (³) de % depleție de peptidă cisteină	Intervalul (³) de % depleție de peptidă lizină
2,4-dinitroclorbenzen	97-00-7	Solidă	Sensibilizant (extrem)	Pozitivă	90-100	15-45
Oxazonă	15646-46-5	Solidă	Sensibilizantă (extrem)	Pozitivă	60-80	10-55
Formaldehidă	50-00-0	Lichidă	Sensibilizantă (puternic)	Pozitivă	30-60	0-24
Benziliden acetona	122-57-6	Solidă	Sensibilizantă (moderat)	Pozitivă	80-100	0-7
Farnesal	19317-11-4	Lichidă	Sensibilizantă (redus)	Pozitivă	15-55	0-25
2,3-Butandionă	431-03-8	Lichidă	Sensibilizantă (redus)	Pozitivă	60-100	10-45
1-butanol	71-36-3	Lichidă	Nesensibilizantă	Negativă	0-7	0-5,5
6-Metilcumarină	92-48-8	Solidă	Nesensibilizantă	Negativă	0-7	0-5,5

Substanțe de verificare	NR. CAS	Starea fizică	Estimare <i>in vivo</i> (¹)	Estimare DPRA (²)	Intervalul (³) de % depleție de peptidă cisteină	Intervalul (³) de % depleție de peptidă lizină
Acid lactic	50-21-5	Lichidă	Nesensibilizantă	Negativă	0-7	0-5,5
4-metoxiacetofenonă	100-06-1	Solidă	Nesensibilizantă	Negativă	0-7	0-5,5

(¹) Pericolele și (potența) estimărilor *in vivo* se bazează pe datele LLNA (19). Potența *in vivo* se calculează pe baza criteriilor propuse de ECETOC (23).

(²) O estimare DPRA se ia în considerare în cadrul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la punctele 9 și 11.

(³) Intervale determinate pe baza a cel puțin 10 valori de depleție generate de 6 laboratoare independente.

Apendicele 3

EXEMPLE DE SECVENȚĂ DE ANALIZĂ

Standarde de calibrare și martori de referință	STD 1 STD 2 STD 3 STD 4 STD 5 STD 6 Soluție tampon de diluție Martor de referință A, rep 1 Martor de referință A, rep 2 Martor de referință A, rep 3
Martori de coeluție	Martor de coeluție 1 pentru substanța chimică de testat 1 Martor de coeluție 2 pentru substanța chimică de testat 2
Martori de referință	Martor de referință B, rep 1 Martor de referință B, rep 2 Martor de referință B, rep 3
Primul set de replici	Martor de referință C, rep 1 Aldehidă cinamică, rep 1 Proba 1, rep 1 Proba 2, rep 1
Al doilea set de replici	Martor de referință C, rep 2 Aldehidă cinamică, rep 2 Proba 1, rep 2 Proba 2, rep 2
Al treilea set de replici	Martor de referință C, rep 3 Aldehidă cinamică, rep 3 Proba 1, rep 3 Proba 2, rep 3
Martori de referință	Martor de referință B, rep 4 Martor de referință B, rep 5 Martor de referință B, rep 6

În secvența de analiză se includ trei seturi de martori de referință (și anume, probe constituite numai din peptidă dizolvată în solventul adecvat):

Martorul de referință A: utilizat pentru a verifica adecvarea sistemului HPLC.

Martorul de referință B: inclus la începutul și la sfârșitul secvenței de analiză pentru a verifica stabilitatea martorilor de referință în timpul analizei.

Martorul de referință C: inclus în secvența de analiză pentru a verifica dacă solventul utilizat pentru a dizolva substanța chimică de testat nu are un impact asupra procentului de depleție de peptidă.

B.60 Sensibilizare cutanată *in vitro*: Metoda de testare a ERA-Nrf2 ale luciferazei

INTRODUCERE

Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE (TG) privind testarea nr. 442D (2015). O substanță sensibilizantă pentru piele se referă la o substanță care conduce la o reacție alergică în urma contactului cu pielea, astfel cum este definită în Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU) (1) și în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ⁽¹⁾. Această metodă de testare furnizează o procedură *in vitro* (testul ERA- Nrf2 ale luciferazei) care poate să fie utilizată pentru susținerea diferențierii între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante în conformitate cu GHS al ONU (1) și CLP.

Există un acord general cu privire la principalele evenimente biologice care stau la baza sensibilizării cutanate. Cunoștințele existente despre mecanismele biologice și chimice asociate cu sensibilizarea cutanată au fost sintetizate sub forma unui parcurs al răspunsurilor adverse (Adverse Outcome Pathway – AOP) (2), începând de la evenimentul declanșator molecular, la evenimentele intermediare până la efectele adverse asupra sănătății, și anume dermatita alergică de contact la oameni sau hipersensibilitatea de contact la rozătoare (2) (3). Evenimentul declanșator molecular este legarea covalentă a substanțelor electrofile de centrele nucleofile ale proteinelor din piele. Al doilea eveniment important în acest AOP se desfășoară în cheratinocite și include răspunsuri inflamatorii, precum și expresia genică asociată cu parcursurile de semnalizare de celule specifice, precum parcursurile care depind de elemente de răspuns antioxidant/electrofil (ERA). Al treilea eveniment important este activarea celulelor dendritice, de regulă evaluate prin exprimarea markerilor celulari de suprafață specifici, chemochine și citocine. Al patrulea eveniment important este proliferarea celulară T, care este evaluată în mod indirect în testul local asupra ganglionilor limfatici de la murini (4).

Evaluarea sensibilizării cutanate a implicat, în general, utilizarea de animale de laborator. Metodele clasice bazate pe cobai, testul de maximizare Magnusson și Kligman (GMPT), testul Buehler [(MT B.6 (5)] studiază atât fazele de inducție, cât și cele de reacție de hipersensibilitate a sensibilizării cutanate. Un test pe murini, testul local asupra ganglionilor limfatici (LLNA) [MT B.42 (4)] și cele două variante ale sale neradioactive, LLNA: DA [MT B.50 (6)] și LLNA: BrdU-ELISA [MT B.51 (7)], care toate evaluează în mod exclusiv reacția de inducție, au beneficiat, de asemenea, de acceptare, întrucât acestea oferă un avantaj față de testele pe cobai din punct de vedere al bunăstării animalelor și măsurarea obiectivă a fazei de inducție a sensibilizării cutanate.

Mai recent, metode de testare pe bază mecanică *in chemico* și *in vitro* au fost considerate valabile din punct de vedere științific pentru evaluarea pericolelor de sensibilizare cutanată ale substanțelor chimice. Cu toate acestea, vor fi necesare combinații de metode care nu se bazează pe animale (*in silico*, *in vitro*, *in chemico*) în cadrul strategiilor integrate de testare și evaluare (Integrated Approaches to Testing and Assessment – IATA) pentru a putea înlocui complet testele pe animale utilizate în prezent, având în vedere gradul restrâns de acoperire automată al AOP al fiecărei metode de testare care nu implică animale, disponibilă în prezent (2) (3).

Această metodă de testare (testul ERA-Nrf2 ale luciferazei) este propusă pentru a aborda al doilea eveniment important, astfel cum se explică la punctul 2. Substanțele sensibilizante pentru piele au fost raportate ca determinând gene care sunt reglementate de elementul de răspuns antioxidant (ERA) (8) (9). Substanțele electrofile mici precum substanțele sensibilizante pentru piele pot acționa asupra proteinei senzor Keap1 (proteina 1 kelch asociată cu epiclorhidrina) prin, de exemplu, modificarea covalentă a reziduurilor de cisteină, având ca rezultat disocierea acestora de factorul de transcripție Nrf2 (factor 2 nuclear legat de factorul eritroidului 2). Nrf2 disociat poate ulterior să activeze gene dependente de ERA, precum cele care codează pentru faza II a enzimelor detoxifiante (8) (10) (11).

În prezent, singurul test *in vitro* ERA-Nrf2 ale luciferazei reglementat de prezenta metodă de testare este testul KeratinoSens™ pentru care au fost finalizate studiile de validare (9) (12) (13), urmate de o evaluare independentă inter pares efectuată de laboratorul de referință al Uniunii Europene pentru metode alternative la testarea pe animale (EURL ECVAM) (14). Testul KeratinoSens™ a fost considerat valabil din punct de vedere științific pentru a fi utilizat ca parte a unei IATA, pentru a sprijini diferențierea între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante în scopul clasificării pericolelor și etichetării (14). Laboratoarelor care doresc să pună în aplicare metoda de testare pot obține linia celulară recombinantă utilizată în testul KeratinoSens™ prin instituirea unui acord de licență cu dezvoltatorul metodei de testare (15).

⁽¹⁾ Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353, 31.12.2008, p. 1.

Definițiile sunt prevăzute în apendicele 1.

CONSIDERAȚII INIȚIALE, APLICABILITATE ȘI LIMITĂRI

Având în vedere faptul că activarea parcursului ERA-Nrf2-keap 1 se referă doar la al doilea eveniment important al AOP privind sensibilizarea cutanată, este puțin probabil ca informațiile de la metodele de testare bazate pe activarea acestui parcurs să fie suficiente atunci când sunt utilizate singure pentru a concluziona în privința potențialului de sensibilizare cutanată al substanțelor chimice. Prin urmare, datele generate în cadrul acestei metode de testare se iau în considerare în contextul unor abordări integrate precum IATA, în combinație cu alte informații complementare, de exemplu obținute din teste *in vitro*, care abordează alte evenimente importante ale AOP privind sensibilizarea cutanată, precum și prin metode care nu fac recurs la testări, inclusiv extrapolări ale datelor referitoare la substanțe chimice analoge. Exemple privind modalitatea de utilizare a metodei de testare a ERA-Nrf2 ale luciferazei în combinație cu alte informații sunt raportate în referințele bibliografice (13) (16) (17) (18) (19).

Această metodă de testare poate fi utilizată pentru susținerea diferențierii între substanțele sensibilizante pentru piele (categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și cele nesensibilizante în contextul IATA. Această metodă de testare nu poate fi utilizată în mod independent, nici cu scopul de a subcategoriza substanțele sensibilizante pentru piele în subcategoriile 1A și 1B, astfel cum sunt definite de GHS al ONU/Regulamentul CLP, nici pentru a efectua estimări cu privire la potența pentru decizii în materie de evaluare a siguranței. Cu toate acestea, în funcție de cadrul de reglementare, un rezultat pozitiv poate fi utilizat singur pentru a clasifica o substanță chimică în categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP.

Pe baza setului de date din studiul de validare și testarea internă utilizată pentru evaluarea inter pares independentă a metodei de testare, testul KeratinoSens™ s-a dovedit a fi transferabil către laboratoare cu experiență în cultură celulară. Nivelul de reproductibilitate în estimări care poate fi preconizat din metoda de testare este de ordinul a 85 % în cadrul aceluiași laborator și între laboratoare (14). Precizia (77 % – 155/201), sensibilitatea (78 % – 76 %) și specificitatea (76 % -84/110) testului KeratinoSens™ pentru diferențierea substanțelor sensibilizante pentru piele (și anume, cat. 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) față de cele nesensibilizante în comparație cu rezultatele LLNA au fost calculate luând în considerare toate datele transmise EURL ECVAM pentru evaluarea propriu-zisă și evaluarea inter pares a metodei de testare (14). Aceste cifre sunt similare celor publicate recent pe baza testării interne a aproximativ 145 de substanțe (acuratețe 77 %, sensibilitate 79 %, specificitate 72 %) (13). Testul KeratinoSens™ are mai multe șanse să subestimeze substanțele chimice care prezintă un nivel scăzut până la moderat de potență de sensibilizare cutanată (și anume, subcategoria 1B din GHS al ONU/Regulamentul CLP) față de substanțele chimice care prezintă un grad ridicat de potență de sensibilizare cutanată (și anume, subcategoria 1A din GHS al ONU/Regulamentul CLP) (13) (14). Luate împreună, aceste informații indică utilitatea testului KeratinoSens™ la contribuirea identificării pericolelor de sensibilizare cutanată. Cu toate acestea, valorile de acuratețe furnizate în prezentul document pentru testul KeratinoSens™ ca metodă de testare de sine stătătoare sunt doar orientative, întrucât metoda de testare se ia în considerare în combinație cu alte surse de informații în contextul unui IATA și în conformitate cu dispozițiile de la punctul 9 de mai sus. În plus, la evaluarea metodelor care nu se bazează pe animale pentru sensibilizarea cutanată se ia în vedere faptul că LLNA, precum și alte teste pe animale nu pot reflecta pe deplin situația pentru specia de interes, și anume oamenii.

Termenul „substanță chimică de testat” este utilizată în prezenta metodă de testare pentru a se referi la ceea ce este supus testării și nu are legătură cu aplicabilitatea metodei de testare a ERA-Nrf2 ale luciferazei la testarea unor substanțe și/sau amestecuri. Pe baza datelor actuale disponibile, testul KeratinoSens™ s-a dovedit a fi aplicabil substanțelor chimice de testat care acoperă o varietate de grupe organice funcționale, mecanisme de reacție, potență de sensibilizare cutanată (astfel cum a fost determinat prin intermediul studiilor *in vivo*) și proprietăți fizico-chimice (9) (12) (13) (14). În principal au fost testate substanțe monocomponente, cu toate că există, de asemenea, un volum limitat de date cu privire la testarea amestecurilor (20). Metoda de testare este aplicabilă, cu toate acestea, din punct de vedere tehnic pentru testarea substanțelor multicomponente și a amestecurilor. Cu toate acestea, înainte de utilizarea acestei metode de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare specific, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate în scopul respectiv. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului. În plus, atunci când se testează substanțe multicomponente sau amestecuri, se ia în considerare posibila interferență a componentelor citotoxice cu răspunsurile observate. Metoda de testare este aplicabilă substanțelor chimice de testat solubile sau care formează dispersii stabile (și anume, un coloid sau o suspensie în care substanța chimică de testat nu decantează sau se separă de solvent în diferite faze), fie în apă

sau în DMSO (inclusiv toate componentele substanței chimice de testat, în cazul testării unei substanțe multicomponente sau un amestec). Substanțele chimice de testat care nu îndeplinesc aceste condiții la concentrația maximă finală necesară de 2000 μM (a se vedea punctul 22) pot fi testate, cu toate acestea, la concentrații mai mici. Într-un astfel de caz, rezultatele care îndeplinesc criteriile de pozitivitate descrise la punctul 39 pot fi utilizate în continuare pentru a sprijini identificarea substanței chimice de testat ca sensibilizant al pielii, în timp ce un rezultat negativ obținut cu concentrații < 1000 μM se ia în considerare drept neconcludent (a se vedea modelul predictiv de la punctul 39). În general, substanțele cu log P de până la 5 au fost testate cu succes, în timp ce substanțele foarte hidrofobe cu log P cu o valoare de peste 7 se încadrează în afara aplicabilității cunoscute a acestei metode de testare (14). Pentru substanțele cu log P cuprins între 5 și 7, sunt disponibile informații limitate.

Rezultatele negative se interpretează cu prudență deoarece substanțele cu o reactivitate exclusivă față de reziduurile de lizină pot fi detectate ca fiind negative prin metoda de testare. În plus, din cauza capacității metabolice limitate a liniei celulare utilizate (21), cât și din cauza condițiilor experimentale, prohaptenele (și anume, substanțele chimice care necesită activare enzimatică, de exemplu prin intermediul enzimelor P 450) și prehaptenele (și anume, substanțe chimice activate prin autooxidare), în special cele cu o rată de oxidare lentă pot furniza, de asemenea, rezultate negative. În același timp, substanțele chimice de testat care nu acționează ca un sensibilizant, dar care sunt, cu toate acestea, factori chimici de stres, pot conduce la rezultate fals pozitive (14). În plus, substanțele chimice de testat cu citotoxicitate ridicată nu pot fi evaluate întotdeauna într-o manieră fiabilă. În cele din urmă, substanțele chimice de testat care interferează cu enzima luciferază pot crea confuzii în activitatea luciferazei în testele pe bază de celule care provoacă fie o inhibare aparentă, fie o creștere a luminiscenței (22). De exemplu, concentrațiile de fitoestrogen mai mari de 1 μM au fost raportate a interfera cu semnalele de luminiscență ale altor teste a genei reporter pe bază de luciferază din cauza supraactivării genei luciferază reporter (23). În consecință, expresia luciferazei obținută la concentrații ridicate de fitoestrogeni sau substanțe chimice similare susceptibile de a produce supraestimare fitoestrogenică a genei luciferază reporter se examinează cu atenție (23). În cazul în care poate fi demonstrată existența unor dovezi privind lipsa de aplicabilitate a metodei de testare la alte categorii specifice de substanțe chimice de testat, metoda de testare nu se utilizează pentru respectivele categorii specifice.

În plus față de sprijinirea diferențierii între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante, testul KeratinoSensTM furnizează, de asemenea, informații cu privire la concentrație-răspuns care ar putea contribui la evaluarea potenței de sensibilizare atunci când este utilizat în abordări integrate precum IATA (19). Cu toate acestea, sunt necesare în continuare lucrări, de preferință bazate pe date provenite din studii pe subiecți umani fiabili, pentru a putea determina modul în care rezultatele testului KeratinoSensTM pot contribui la evaluarea potenței (24) și la subcategorizarea substanțelor sensibilizante în conformitate cu GHS al ONU/Regulamentul CLP.

PRINCIPIUL TESTULUI

Metoda de testare a ARE-Nrf2 ale luciferazei utilizează o linie celulară imortalizată aderentă derivată din cheratinocite umane HaCaT transfectate cu o plasmidă selectabilă. Linia celulară conține gena luciferază sub controlul transcripțional al unui promotor constitutiv fuzionat cu un element ERA dintr-o genă despre care se cunoaște că este supreglată de substanțe sensibilizante la contact (25) (26). Semnalul luciferazei reflectă activarea prin substanțe sensibilizante a genelor endogene dependente Nrf2 și dependența semnalului luciferazei în linia celulară recombinantă de proteina Nrf2 a fost demonstrată (27). Acest lucru permite măsurarea cantitativă (prin detecția de luminiscență) a inducției genei luciferază, utilizând substraturi de luciferază bine stabilite ca indicator al activității factorului de transcripție Nrf2 în celule în urma expunerii la substanțe electrofile.

Substanțele chimice de testat sunt considerate pozitive în testul KeratinoSensTM în cazul în care acestea induc o inducție semnificativă din punct de vedere statistic a activității luciferazei peste un anumit prag (și anume, > 1,5 ori sau o creștere de 50 %), sub o concentrație definită care nu afectează în mod semnificativ viabilitatea celulară [și anume, sub 1000 μM și la o concentrație la care viabilitatea celulară este mai mare de 70 % (9) (12)]. În acest scop, se determină inducția maximă a activității luciferazei asupra martorului solvent (negativ) (I_{max}). În plus, având în vedere faptul că celulele sunt expuse la serii de concentrații ale substanțelor chimice de testat, concentrația necesară pentru o inducție semnificativă din punct de vedere statistic a activității luciferazei peste limita superioară a pragului (și anume, valoare $\text{CE}_{1,5}$) se interpolează din valoarea curbei doză-răspuns (a se vedea punctul 32 pentru calcule). În cele din urmă, se efectuează măsurători paralele de citotoxicitate pentru a se evalua dacă nivelurile de inducție de activitate a luciferazei apar la niveluri de concentrație sub nivelul de toxicitate.

Înainte de utilizarea sistematică a testului ERA-Nrf2 ale luciferazei care aderă la prezenta metodă de testare, laboratoarele trebuie să demonstreze performanțele tehnice proprii utilizând cele zece substanțe de verificare enumerate în apendicele 2.

Standarde de performanță (SP) (28) sunt disponibile pentru a facilita validarea unor metode de testare *in vitro* ale ERA-Nrf2 ale luciferazei noi sau modificate, similare cu testul KeratinoSens™ și permit modificarea la timp a acestei metode de testare pentru includerea acestora. Acceptarea reciprocă a datelor (ARD) în conformitate cu acordul OCDE va fi garantată doar pentru metodele de testare validate în conformitate cu SP, în cazul în care respectivele metode de testare au fost revizuite și incluse în orientarea OCDE privind testarea corespunzătoare.

PROCEDURĂ

În prezent, singura metodă reglementată de prezenta metodă de testare este testul KeratinoSens™ valabil din punct de vedere științific (9) (12) (13) (14). Procedurile standard de operare (PSO) ale testului KeratinoSens™ sunt disponibile și se utilizează la punerea în aplicare și utilizarea metodei de testare în laborator (15). Laboratoarelor care doresc să pună în aplicare metoda de testare pot obține linia celulară recombinantă utilizată în testul KeratinoSens™ prin instituirea unui acord de licență cu dezvoltatorul metodei de testare. Următoarele alineate furnizează o descriere a principalelor componente și proceduri ale metodei de testare a ERA-Nrf2 ale luciferazei.

Pregătirea culturilor de cheratinocite

Se utilizează o linie celulară transgenică cu un nivel stabil de introgresie a genei luciferază reporter sub controlul unui element ERA (de exemplu, linia celulară KeratinoSens™). În momentul primirii, se propagă celulele (de exemplu, de la 2 la 4 pasaje) și se depozitează înghețate ca stoc omogen. Celulele din acest stoc inițial pot fi propagate până la un număr maxim de pasaje (și anume, 25 în cazul KeratinoSens™) și se utilizează pentru testele de rutină cu ajutorul mediului de întreținere corespunzător (în cazul KeratinoSens™, aceasta reprezintă DMEM care conține ser și geneticină).

Pentru testări, celulele trebuie să fie confluențe în proporție de 80-90 % și se acordă o atenție deosebită pentru se asigura ca celulele să nu fie cultivate până la confluență completă. Cu o zi înainte de testare, se recoltează celulele și se distribuie în plăci cu 96 de godeuri (10 000 celule/godeu în cazul KeratinoSens™). Se acordă atenție deosebită pentru a evita sedimentarea celulelor în timpul însămânțării cu scopul de a asigura distribuția omogenă a numărului de celule în godeuri. În caz contrar, această etapă poate genera variabilitate ridicată de la godeu la godeu. Pentru fiecare repetare se utilizează trei replici pentru măsurătorile activității luciferazei și o replică pentru testul de viabilitate celulară.

Pregătirea substanței chimice de testat și a substanțelor martor

Substanța chimică de testat și substanțele martor se pregătesc în ziua testării. Pentru testul KeratinoSens™, substanțele chimice de testat se dizolvă în dimetilsulfoxid (DMSO) la concentrația finală dorită (de exemplu, 200 mM). Soluțiile de DMSO pot fi considerate autosterilizatoare, astfel încât filtrarea sterilă nu este necesară. Substanța chimică de testat care nu este solubilă în DMSO se dizolvă în apă sterilă sau mediu de cultură, iar soluțiile se sterilizează, de exemplu, prin filtrare. În cazul unei substanțe chimice de testat care nu are o masă moleculară (Mw) definită, se prepară o soluție mamă la o concentrație prestabilită [40 mg/mL sau 4 % (g/v)] în testul KeratinoSens™. În cazul în care se utilizează alți solvenți decât DMSO, apă sau mediu de cultură, este necesară furnizarea de justificări științifice suficiente.

În funcție de soluțiile mamă DMSO ale substanței chimice de testat, se realizează diluții repetate utilizând DMSO pentru a obține 12 concentrații de bază ale substanței chimice care urmează să fie testată (de la 0,098 la 200 mM în testul KeratinoSens™). În cazul unei substanțe chimice de testat care nu este solubilă în DMSO, diluțiile utilizate pentru a obține concentrațiile de bază se efectuează utilizând apă sterilă sau un mediu de cultură steril. Independent de solventul utilizat, se diluează ulterior concentrațiile de bază de 25 de ori în mediu de cultură care conține ser și, în cele din urmă, se utilizează pentru tratamentul cu un factor de diluție suplimentar de 4 ori astfel încât concentrațiile finale de substanță chimică de testat să se încadreze într-o plajă de valori de la 0,98 la 2000 μ M în testul KeratinoSens™. Se pot utiliza concentrații alternative pe baza unei justificări (de exemplu, în cazul citotoxicității sau al solubilității scăzute).

Martorul negativ (solvent) utilizat în testul KeratinoSens™ este DMSO (Nr. CAS 67-68-5, puritate $\geq 99\%$), pentru care se pregătesc șase godeuri pentru fiecare placă. Acesta suferă aceeași diluție descrisă pentru concentrațiile de bază de la punctul 22, astfel încât concentrația finală de mator negativ (solvent) este de 1 %, despre care se știe că nu afectează viabilitatea celulară și este corespunzătoare cu aceeași concentrație de DMSO a substanței chimice de testat și a matorului pozitiv. În cazul unei substanțe chimice de testat care nu este solubilă în DMSO, pentru care se efectuează diluții în apă, nivelul de DMSO în toate godeurile soluției finale de testat trebuie ajustat la 1 %, la fel ca pentru celelalte substanțe chimice de testat și substanțe mator.

Martorul pozitiv utilizat în cazul testului KeratinoSens™ este aldehida cinamică (Nr. CAS 14371-10-9, puritate $\geq 98\%$), pentru care o serie de 5 concentrații de bază variind de la 0,4 la 6,4 mM se pregătesc în DMSO (de la soluție mamă de 6,4 mM) și se diluează astfel cum este descris pentru concentrațiile de bază de la punctul 22, astfel încât concentrația finală a matorului pozitiv să se încadreze într-o plajă de valori de la 4 la 64 μ M. Se pot utiliza alți matori pozitivi adecvați, de preferință care să furnizeze valori medii $CE_{1,5}$ în cazul în care sunt disponibile date anterioare pentru a obține criteriile de acceptare a utilizării comparabile.

Aplicarea substanței chimice de testat și a substanțelor mator

Pentru fiecare substanță chimică de testat și substanță mator pozitiv este necesar un experiment pentru a obține o estimare (pozitivă sau negativă), constituită din cel puțin două repetări independente, fiecare conținând trei replici (și anume, $n = 6$). În cazul unor rezultate discordante între cele două repetiții, se efectuează o a treia repetare conținând trei replici (și anume, $n = 9$). Fiecare repetiție independentă se efectuează în altă zi, cu soluții mamă proaspete de substanțe chimice de testat și celule recoltate în mod independent. Cu toate acestea, celulele pot să provină din același pasaj.

În urma însămânțării, astfel cum este descris la punctul 20, se cultivă celulele timp de 24 de ore în plăcile de microtitrare cu 96 de godeuri. Mediul este apoi îndepărtat și înlocuit cu un mediu de cultură proaspăt (150 μ l mediu de cultură fără ser, conținând geneticină în cazul KeratinoSens™), la care se adaugă 50 μ l de substanță chimică de testat și substanțe mator diluate de 25 de ori. Cel puțin un godeu la fiecare placă de microtitrare se lasă gol (fără celule și fără tratament) pentru a evalua valori de bază.

Se incubează ulterior plăcile tratate timp de aproximativ 48 de ore la o temperatură de 37 ± 1 °C în prezența a 5 % CO_2 în testul KeratinoSens™. Se acordă atenție deosebită pentru a se evita evaporarea substanțelor chimice volatile și contaminarea încrucișată între godeuri a substanțelor chimice de testat prin, de exemplu, acoperirea plăcilor cu o folie înainte de incubarea cu substanțele chimice de testat.

Măsurători de activitate ale luciferazei

Trei factori sunt esențiali pentru a asigura citiri adecvate ale luminiscenței:

- alegerea unui luminometru sensibil,
- utilizarea unui format de placă de microtitrare cu o înălțime suficientă pentru a evita contaminarea încrucișată cu lumina și
- utilizarea unui substrat de luciferază cu putere suficientă de lumină pentru a asigura un nivel suficient de sensibilitate și o variabilitate scăzută.

Înainte de testare, se efectuează un experiment de control, astfel cum este descris în apendicele 3, astfel încât să se asigure îndeplinirea acestor trei puncte.

După expunerea timp de 48 de ore la substanța chimică de testat și substanțele martor în testul KeratinoSens™, se spală celulele cu o soluție salină tamponată cu fosfat și se adaugă tamponul de lizare pentru citirile luminiscentei în fiecare godeu timp de 20 minute la temperatura camerei.

Se plasează ulterior plăcile cu lizatul de celule în luminometru pentru citire, care în testul KeratinoSens™ este programat: (i) să adauge substratul de luciferază la fiecare godeu (și anume, 50 µl), (ii) să aștepte timp de 1 secundă și (iii) să integreze activitatea luciferazei timp de 2 secunde. În cazul în care se utilizează setări alternative, de exemplu, în funcție de modelul de luminometru utilizat, acestea necesită justificare. În plus, un substrat de preîncălzire poate fi utilizat, de asemenea, cu condiția ca experimentul de control al calității din apendicele 3 să fie îndeplinit cu succes.

Evaluarea citotoxicității

În cazul testului de viabilitate celulară KeratinoSens™, mediul se înlocuiește după expunerea timp de 48 de ore cu mediu proaspăt care conține MTT[bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu, bromură de tiazolil albastru tetrazoliu; nr. CAS 298-93-1] și se incubează celulele timp de 4 ore la 37 °C în prezența a 5 % CO₂. Se îndepărtează ulterior mediul cu MTT și se lizează celulele (de exemplu, prin adăugarea a 10 % soluție SDS la fiecare godeu) peste noapte. După agitare, se măsoară absorbția și anume, la 600 nm cu ajutorul unui fotometru.

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea datelor

În cadrul testului KeratinoSens™ se calculează următorii parametri:

- coeficientul de inducție medie maximă a valorii activității luciferazei ($I_{\max}$) observat la orice concentrație de substanță chimică de testat și martor pozitiv;
- valoarea $CE_{1,5}$ care reprezintă concentrația la care inducția activității luciferazei este peste pragul de 1,5 de ori (și anume, activitatea luciferazei cu 50 % mai mare); și
- concentrațiile valorilor CI_{50} și CI_{30} pentru reducerea cu 50 % și 30 % a viabilității celulare.
- Coeficientul de inducție a activității luciferazei se calculează prin ecuația 1, iar coeficientul de inducție maximă generală ($I_{\max}$) se calculează ca medie a repetițiilor individuale.

Ecuația 1:

$$\text{Coeficientul de inducție} = \frac{(L_{\text{probă}} - L_{\text{alb}})}{(L_{\text{solvent}} - L_{\text{alb}})}$$

unde

$L_{\text{probă}}$ este valoarea citirii luminiscentei în godeul cu substanță chimică de testat

L_{gol} este valoarea citirii luminiscentei în godeul gol care nu conține nici celule, nici tratament

L_{solvent} este media valorilor citirilor luminiscentei în godeurile care conțin celule și martorul solvent (negativ)

$CE_{1,5}$ se calculează prin interpolare liniară, conform ecuației 2 și $CE_{1,5}$ generală se calculează ca media geometrică a repetițiilor individuale.

Ecuția 2:

$$EC_{1,5} = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1,5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

unde

C_a este concentrația minimă în μM cu inducție $> 1,5$ ori

C_b este concentrația maximă în μM cu inducție $< 1,5$ ori

I_a este coeficientul de inducție măsurat la concentrația minimă cu inducție $> 1,5$ ori (media a trei godeuri replici)

I_b este coeficientul de inducție la concentrația maximă cu inducție $< 1,5$ ori (media a trei godeuri replici)

Viabilitatea se calculează prin ecuația 3:

Ecuția 3:

$$Viabilitate = \frac{(V_{\text{probă}} - V_{\text{alb}})}{V_{\text{solvent}} - V_{\text{alb}}} \times 100$$

unde

$V_{\text{probă}}$ este valoarea citirii absorbantei MTT în godeul care conține substanța chimică de testat

V_{gol} este valoarea citirii absorbantei MTT în godeul gol care nu conține celule sau tratament

V_{solvent} este media valorilor citirii absorbantei MTT în godeurile care conțin celule și martor solvent (negativ)

CI_{50} and CI_{30} se calculează prin interpolare liniară, conform ecuației 4 și CI_{50} and CI_{30} generale se calculează ca medie geometrică a repetițiilor individuale.

Ecuția 4:

$$IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

unde

X este % de reducere la concentrația care urmează să fie calculată (50 și 30 pentru CI_{50} and CI_{30})

C_a este concentrația minimă în μM cu $> x$ % reducere în ceea ce privește viabilitatea

C_b este concentrația maximă în μM cu $< x$ % reducere în ceea ce privește viabilitatea

V_a este % de viabilitate la concentrația minimă cu $> x$ % reducere în ceea ce privește viabilitatea

V_b este % de viabilitate la concentrația maximă cu $< x$ % reducere în ceea ce privește viabilitatea

Pentru fiecare concentrație care prezintă $> 1,5$ ori inducție a activității luciferazei, se calculează semnificația statistică [de exemplu, printr-un test t student cu două eșantioane], comparând valorile luminiscentei pentru cele trei probe replici cu valorile luminiscentei în godeurile care conțin martor solvent (negativ) pentru a determina dacă inducția activității luciferazei este semnificativă din punct de vedere statistic ($p < 0,05$). Concentrația minimă cu $> 1,5$ ori inducție a activității luciferazei este valoarea care determină valoarea $CE_{1,5}$. Aceasta se verifică în fiecare caz indiferent dacă valoarea este inferioară valorii CI_{30} , indicând o reducere mai mică de 30 % a viabilității celulare la concentrația determinantă $CE_{1,5}$.

Se recomandă verificarea vizuală a datelor cu ajutorul graficelor. În cazul în care nu se observă în mod clar o curbă doză-răspuns sau în cazul în care curba doză-răspuns obținută este bifazică (și anume, depășirea de două ori a pragului de 1,5) experimentul se repetă pentru a verifica dacă acestea sunt specifice substanței chimice de testat sau sunt cauzate de artefacte experimentale. În cazul în care răspunsul bifazic este reproductibil în cadrul unui experiment independent, se raportează cea mai scăzută valoare $CE_{1,5}$ (concentrația la prima depășire a pragului de 1,5).

În cazurile rare în care se observă o inducție nesemnificativă din punct de vedere statistic de peste 1,5 ori urmată de o concentrație mai mare cu o inducție semnificativă din punct de vedere statistic, rezultatele obținute din această repetare sunt considerate valabile și pozitive doar în cazul în care inducția semnificativă din punct de vedere static care depășește pragul de 1,5 a fost obținută pentru o concentrație necitotoxică.

În cele din urmă, în cazul substanțelor chimice de testat care deja generează o inducție de 1,5 de ori sau mai mare la concentrația minimă de testare de 0,98 μM , valoarea $CE_{1,5} < 0,98$ se stabilește pe baza inspecției vizuale a curbei doză-răspuns.

Criterii de acceptare

Criteriile de acceptare menționate în continuare trebuie îndeplinite la utilizarea testului KeratinoSens™. În primul rând, inducția activității luciferazei obținută cu martorul pozitiv, aldehida cinamică, trebuie să fie semnificativă din punct de vedere statistic peste pragul de 1,5 (de exemplu, utilizând un test t) în cel puțin una dintre concentrațiile testate (de la 4 la 64 μM).

În al doilea rând, valoarea $CE_{1,5}$ trebuie să se încadreze între două deviații standard ale valorii medii anterioare ale instalației de testare (de exemplu, între 7 μM și 30 μM pe baza setului de date de validare), care trebuie să fie actualizată în mod regulat. În plus, rata medie de inducție în cele trei replici pentru aldehida cinamică la 64 μM trebuie să fie între 2 și 8. În cazul în care ultimul criteriu nu este îndeplinit, se verifică cu atenție relația doză-răspuns a aldehydei cinamice și testele pot fi acceptate numai în cazul în care există în mod clar o relație doză-răspuns cu inducție crescută a activității luciferazei la concentrații mărite a martorului pozitiv.

În cele din urmă, coeficientul mediu al variației citirilor de luminiscentă pentru martorul negativ (solvent) DMSO trebuie să fie sub 20 % pentru fiecare repetare care constă în 6 godeuri testate în triplicat. În cazul în care variabilitatea este mai mare, rezultatele se elimină.

Interpretarea rezultatelor și modelul predictiv

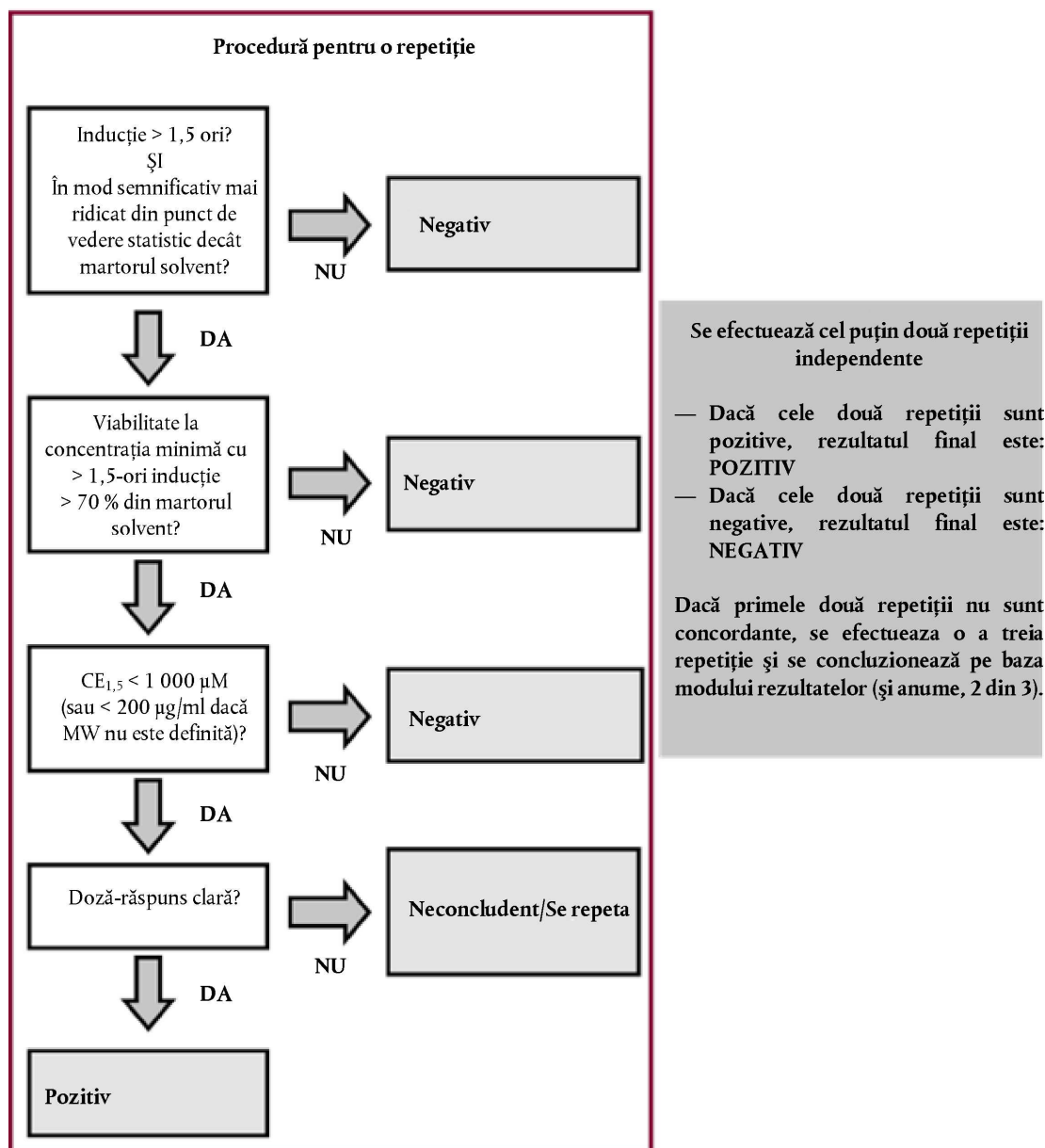
O estimare KeratinoSens™ este considerat pozitivă în cazul în care următoarele 4 condiții sunt îndeplinite în 2 din 2 sau în aceleași 2 din 3 repetări; în caz contrar, estimarea KeratinoSens™ este considerată negativă (figura 1):

1. I_{max} este mai mare ($>$) de 1,5 ori și în mod semnificativ diferită din punct de vedere statistic în comparație cu martorul solvent (negativ) (astfel cum este determinată cu ajutorul unui test t Student cu două eșantioane, neîmperecheate);
2. viabilitatea celulară este mai mare ($>$) de 70 % la concentrația minimă cu inducția activității luciferazei de peste 1,5 de ori (și anume, la concentrația determinantă $CE_{1,5}$);
3. valoarea $CE_{1,5}$ este mai mică ($<$) de 1000 μM (sau $<$ 200 $\mu\text{g/ml}$ pentru substanțele chimice fără MW definită);
4. există o relație doză-răspuns generală aparentă pentru inducția de luciferază (sau un răspuns bifazic astfel cum se menționează la punctul 33).

În cazul în care, în cadrul unei anumite repetări, toate primele trei condiții sunt îndeplinite, dar nu se observă o relație doză-răspuns clară pentru inducția de luciferază, rezultatul respectivei repetări se consideră neconcludent și pot fi necesare testări suplimentare (figura 1). În plus, un rezultat negativ obținut la concentrații $<$ 1000 μM (sau $<$ 200 $\mu\text{g/ml}$ pentru substanțele chimice de testat fără MW definită) se consideră neconcludent (a se vedea punctul 11).

Figura 1

Modelul predictiv utilizat în cadrul testului KeratinoSens™. O estimare KeratinoSens™ se ia în considerare în cadrul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la punctele 9 și 11.



În cazuri rare, substanțele chimice de testat care induc activitatea luciferazei la un nivel foarte apropiat de nivelurile citotoxice pot fi pozitive în anumite repetări la niveluri necitotoxice [și anume, concentrație determinantă $CE_{1,5}$ sub nivelul ($<$) CI_{30}] și în alte repetări numai la niveluri de citotoxicitate [și anume, concentrație determinantă $CE_{1,5}$ mai mare ($>$) decât CI_{30}]. Astfel de substanțe chimice de testat se retestează cu o analiză a relației doză-răspuns mai limitată, utilizând un factor de diluție mai mic [de exemplu, 1,33 sau $\bar{O}2$ ($= 1,41$) ori diluția dintre godeuri] pentru a determina dacă a avut loc sau nu inducție la niveluri citotoxice (9).

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat

— substanță monocomponentă

— Identificare chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

- Aspectul fizic, solubilitatea în apă, solubilitatea DMSO, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, în măsura în care este posibil;
- Purity, identity chemical of impurities, after it is appropriate and feasible from a practical point of view etc.;
- Treatment before the test, if the case (for example, heating, grinding);
- Concentration (concentrations) tested(e);
- Conditions of storage and stability, in the measure in which it is possible.
- substance multicomponent, UVCB and mixture:
 - Characterization, in the measure in which it is possible, for example identity chemical (as seen above), purity, appearance quantitative and physico-chemical properties relevant (as seen above) of components, in the measure in which it is possible;
 - Aspectul fizic, solubilitatea în apă, solubilitatea DMSO și alte proprietăți fizico-chimice relevante, în măsura în care este posibil;
 - Molecular mass or apparent molecular mass in the case of mixtures/polymers with known composition or other relevant information for the test;
 - Treatment before the test, if the case (for example, heating, grinding);
 - Concentration (concentrations) tested (tested);
 - Conditions of storage and stability, in the measure in which it is possible.

Martori

- Martor pozitiv
 - Identification chemical, such as name (names) IUPAC or CAS, number (numbers) SMILES or code InChI, structural formula and/or other identifiers;
 - Aspectul fizic, solubilitatea în apă, solubilitatea DMSO, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, în măsura în care este posibil și dacă este cazul;
 - Purity, identity chemical of impurities, after it is appropriate and feasible from a practical point of view etc.;
 - Treatment before the test, if the case (for example, heating, grinding);
 - Concentration (concentrations) tested(e);
 - Conditions of storage and stability, in the measure in which it is possible;
 - Referring to previous results of positive samples which demonstrate adequate acceptance criteria for determination, if the case.
- Martor negativ (vehicul)
 - Identification chemical, such as name (names) IUPAC or CAS, number (numbers) CAS and/or other identifiers;
 - Purity, identity chemical of impurities, after it is appropriate and feasible from a practical point of view etc.;
 - Aspectul fizic, masa moleculară și proprietățile fizico-chimice relevante suplimentare în cazul în care se utilizează alți martori negativi/vehicule decât cei menționați în această metodă de testare și în măsura în care este posibil;
 - Conditions of storage and stability, in the measure in which it is possible;
 - Justification of the choice of solvent for each chemical substance tested.

Condițiile metodei de testare

- Numele și adresa sponsorului, ale instalației de testare și ale directorului de studiu;
- Descrierea metodei de testare utilizate;
- Linia celulară utilizată, condițiile de depozitare și sursa acesteia (de exemplu, instalația de la care a fost obținută);
- Numărul de pasaje și nivelul de confluență a celulelor utilizate pentru testare;
- Metoda utilizată pentru numărarea celulelor pentru însămânțare înainte de testare și măsurile luate pentru a asigura distribuția omogenă a numărului de celule (cf. punctul 20);
- Luminometrul utilizat (de exemplu, modelul), inclusiv reglajele instrumentului, substratul de luciferază utilizat, precum și demonstrarea măsurătorilor corespunzătoare de luminiscență pe baza testului de control descris la apendicele 3;
- Procedura utilizată pentru a demonstra performanțele de laborator la efectuarea metodei de testare (de exemplu, prin testarea unor substanțe de verificare) sau pentru a demonstra performanța reproductibilă a metodei de testare în timp.

Procedura de testare

- Numărul de repetări și replici utilizate;
- Concentrațiile substanței chimice de testat, procedura de aplicare și timpul de expunere utilizate (în cazul în care acestea diferă de cele recomandate)
- Descrierea criteriilor de evaluare și de decizie utilizate;
- Descrierea criteriilor de acceptare a studiului utilizate;
- Descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare.

Rezultate

- Prezentarea în formă tabelară a valorilor $I_{\max}$, $CE_{1,5}$ și ale viabilității (și anume, CI_{50} , CI_{30}) obținute pentru substanța chimică de testat și pentru martorul pozitiv la fiecare repetare, precum și valorile medii ($I_{\max}$: valoarea medie; valorile $CE_{1,5}$ și ale viabilității: valoarea medie geometrică) și DS calculate utilizând date din fiecare repetare individuală și o indicație privind clasificarea substanței chimice de testat conform modelului predictiv;
- Coeficientul de variație obținut din citirile luminiscenței pentru martorul negativ pentru fiecare experiment;
- Un grafic care descrie curbele doză-răspuns ale inducției activității luciferazei și viabilității;
- O descriere a oricăror alte observații relevante, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor

- Discutarea rezultatelor obținute cu ajutorul testului KeratinoSens™;
- Luarea în considerare a rezultatelor metodei de testare în contextul unei IATA, în cazul în care sunt disponibile alte informații relevante.

Concluzie

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Disponibil la: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Partea 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.

- (3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of Toxicology* 85, 367-485.
- (4) Capitolul B.42 din prezenta anexă: Sensibilizare dermică: Testul local pe ganglioni limfatici.
- (5) Capitolul B.6 din prezenta anexă: Sensibilizare cutanată.
- (6) Capitolul B.50 din prezenta anexă: Sensibilizare dermică: Testul local pe ganglioni limfatici: DA.
- (7) Capitolul B.51 din prezenta anexă: Sensibilizare dermică: Testul local pe ganglioni limfatici: BrdU-ELISA.
- (8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicological Sciences* 113, 284-292.
- (9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245, 281-290.
- (10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1779-1791.
- (11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1(1), 45-49.
- (12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol. In Vitro* 25, 733-744.
- (13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, 33, 1337-1352.
- (14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 p. Disponibil la: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.
- (15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™, 17 p. Disponibil la: <http://ecvam-dbal.m.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>
- (16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol. Sci.* 107, 106-121.
- (17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 60, 389-400.
- (18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63, 489-504.

- (19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J Appl Toxicol.* 33, 1353-1364.
- (20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. *Toxicology In Vitro* 27, 12201225.
- (21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1969.
- (22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry and Biology* 17, 646-657.
- (23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
- (25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. *J. Invest. Dermatol.*, 126, 1813-1822.
- (26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* 150, 301-316.
- (27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol. in vitro* 27, 22252232.
- (28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N0 213, OECD, Paris.
- (29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.
- (30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides – (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 p. <http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf>
-

Apendicele 1

DEFINIȚII

Precizie: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele „relevanței” acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul „concordanță” pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (29).

AOP (parcursul răspunsurilor adverse): O serie de evenimente din structura chimică a unei substanțe chimice țintă sau un grup de substanțe chimice similare, de la evenimentul declanșator molecular până la un răspuns *in vivo* de interes (2).

ERA: Element de răspuns antioxidant (denumite, de asemenea EpRE, element de răspuns electrofil) este un element de răspuns care se găsește în regiunea promotor amonte a multor gene citoprotective și fază II. Atunci când sunt activate de către Nrf2, acestea mediază inducția transcripțională a genelor respective.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Coeficient de variație: O măsură a variabilității care se calculează pentru un grup de date replici prin împărțirea deviației standard la valoarea medie. Aceasta poate fi multiplicată cu 100 pentru exprimarea ca procent.

CE_{1,5}: Concentrația interpolată pentru o inducție a luciferazei de 1,5 ori.

CI₃₀: Concentrație care are ca efect o reducere cu 30 % a viabilității celulare.

CI₅₀: Concentrație care are ca efect o reducere cu 50 % a viabilității celulare.

Pericol: Proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, un sistem sau o (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

IATA (strategie integrată pentru testare și evaluare): O abordare structurată utilizată pentru identificarea pericolelor (potențial), caracterizarea pericolelor (potență) și/sau evaluarea siguranței (potențial/potență și expunere) pentru o substanță chimică sau un grup de substanțe chimice, care se integrează în mod strategic și măsoară toate datele relevante pentru a furniza informații cu privire la decizii de reglementare în ceea ce privește potențialele pericole și/sau riscuri și/sau necesitatea unor teste suplimentare specifice și, prin urmare, minime.

I_{max}: Factor maxim de inducție a activității luciferazei în comparație cu martorul solvent (negativ) măsurat la orice concentrație a substanței chimice de testat.

Keap 1: Proteina 1 kelch asociată cu epiclorhidrina este o proteină senzor care poate reglementa activitatea Nrf2. În condițiilor neinduse, proteina senzor keap 1 declanșează factorul de transcripție Nrf2 pentru ubicuitinarea și degradarea proteolitică în proteazom. Modificarea covalentă a reziduurilor reactive de cisteină ale keap 1 în molecule mici poate conduce la o disociere a nrf2 din keap 1 (8) (10) (11).

Amestec: Un amestec sau o soluție compusă din două sau mai multe substanțe în care acestea nu reacționează (1).

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în măsură de cel puțin 80 % (g/g).

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care mai mult de un singur component principal este prezent într-o concentrație ≥ 10 % (g/g) și < 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

Nrf2: Factor 2 nuclear rezultat din factorul eritroidului 2 este un factor de transcripție implicat în parcursul răspunsului antioxidant. Atunci când Nrf2 nu este ubicuitinat, acesta se dezvoltă în citoplasmă și se translocă în nucleu, unde se combină cu ERA în regiunea promotor amonte a mai multor gene citoprotective, inițind transcripția acestora (8) (10) (11).

Martor pozitiv: O replică ce conține toate componentele sistemului de testare și care a fost tratată cu o substanță cunoscută pentru faptul că provoacă o reacție pozitivă. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu trebuie să fie excesiv de mare.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop specific. Reprezintă măsura în care testul măsoară și prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include luarea în considerare a acurateții (conformității) unei metode de testare (29).

Fiabilitate: Măsură în care o metodă de testare poate fi reprodusă în timp, în același laborator sau în laboratoare diferite, utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau între laboratoare și a repetabilității în același laborator (29).

Reproductibilitate: Acordul dintre rezultatele obținute în urma testării aceleiași substanțe chimice, utilizând același protocol de testare (a se vedea fiabilitatea) (29).

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active care sunt clasificate în mod corect prin metoda de testare. Acesta permite măsurarea acurateții unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (29).

Martor solvent/vehicul: O replică ce conține toate componentele unui sistem de testare, cu excepția substanței chimice de testat, dar incluzând solventul utilizat. Este utilizat pentru a stabili nivelul de bază al reacției pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată în același solvent.

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate corect prin metoda de testare. Acesta permite măsurarea acurateții unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (29).

Substanță: Elemente chimice și compuși lor în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a menține stabilitatea produsului și orice impuritate rezultată din procesul utilizat, dar cu excepția oricărui solvent care poate fi separat fără a influența stabilitatea substanței sau fără a schimba compoziția acesteia (1).

Substanță chimică de testat: Termenul „substanță chimică de testat” se utilizează pentru a face referință la ceea ce este testat.

Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pericole pentru sănătate și pericole pentru mediu și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, precum pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de siguranță pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului (1).

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produse de reacție complexă sau materiale biologice.

Metoda de testare valabilă: O metodă de testare considerată a avea suficientă relevanță și fiabilitate pentru un scop specific și care se bazează pe principii solide din punct de vedere științific. O metodă de testare nu este niciodată valabilă într-un sens absolut, ci doar în legătură cu un scop definit (29).

Apendicele 2

SUBSTANȚE DE VERIFICARE

Sensibilizare cutanată *in vitro*: Metoda de testare a ERA-Nrf2 ale luciferazei

Înainte de utilizarea sistematică a acestei metode de testare, laboratoarele trebuie să demonstreze performanțele tehnice proprii prin obținerea în mod corect a estimării KeratinoSens™ pentru cele 10 substanțe de verificare recomandate în tabelul 1 și prin obținerea de valori pentru CE_{1,5} și CI₅₀ care să se încadreze în plaja de valori de referință corespunzătoare pentru cel puțin 8 dintre cele 10 substanțe de verificare. Substanțele de verificare au fost selectate pentru a reprezenta intervalul de reacții pentru pericolele sensibilizării cutanate. Alte criterii de selecție au fost disponibilitatea comercială, disponibilitatea referințelor *in vivo* de calitate superioară și disponibilitatea datelor *in vitro* de calitate superioară din testul KeratinoSens™.

Tabelul 1

Substanțe recomandate pentru a demonstra performanțele tehnice cu testul KeratinoSens™

Substanțe de verificare	Nr. CAS	Forma fizică	Estimare <i>in vivo</i> ⁽¹⁾	Estimare KeratinoSens™ ⁽²⁾	Interval de referință CE _{1,5} (μM) ⁽³⁾	Interval de referință CI ₅₀ (μM) ⁽³⁾
Izopropanol	67-63-0	Lichid	Nesensibilizant	Negativ	> 1 000	> 1 000
Acid salicilic	69-72-7	Solid	Nesensibilizant	Negativ	> 1 000	> 1 000
Acid lactic	50-21-5	Lichid	Nesensibilizant	Negativ	> 1 000	> 1 000
Glicerol	56-81-5	Lichid	Nesensibilizant	Negativ	> 1 000	> 1 000
Alcool cinamilic	104-54-1	Solid	Sensibilizant (reduc)	Pozitiv	25 – 175	> 1 000
Etilenglicol dime-tacrilat	97-90-5	Lichid	Sensibilizant (reduc)	Pozitiv	5 – 125	> 500
2-mercaptobenzo-tiazol	149-30-4	Solid	Sensibilizant (moderat)	Pozitiv	25 – 250	> 500
Metildibromo-glu-taronitril	35691-65-7	Solid	Sensibilizant (puternic)	Pozitiv	< 20	20 – 100
4-metilaminofenol sulfat	55-55-0	Solid	Sensibilizant (puternic)	Pozitiv	< 12,5	20 – 200
2,4- dinitro-cloro-benzen	97-00-7	Solid	Sensibilizant (extrem)	Pozitiv	< 12,5	5 – 20

⁽¹⁾ Estimările pericolului *in vivo* (și potenței) se bazează pe date LLNA (13). Potența *in vivo* se calculează pe baza criteriilor propuse de ECETOC (24).

⁽²⁾ O estimare KeratinoSens™ se ia în considerare în cadrul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la punctele 9 și 11 din prezenta metodă de testare.

⁽³⁾ Pe baza valorilor anterioare observate (12).

Apendicele 3

CONTROLUL CALITĂȚII PENTRU MĂSURĂTORILE LUMINESCENȚEI

Experiment de bază pentru asigurarea unor măsurători optime ale luminiscentenței în testul KeratinoSens™

Următorii trei parametri sunt esențiali pentru a asigura obținerea unor rezultate fiabile cu ajutorul luminometrului:

- existența unui grad suficient de sensibilitate cu un mediu stabil în godeurile mator;
- inexistența unui gradient pentru placa de microtitrare din cauza duratelor lungi de citire; și
- necontaminarea cu lumină în godeurile adiacente din godeurile foarte active.

Înainte de testare, se recomandă asigurarea de măsurători corespunzătoare ale luminiscentenței prin testarea unei plăci de microtitrare mator configurată astfel cum se descrie mai jos (analiză în triplicat).

Configurația plăcii de microtitrare a primului experiment de pregătire

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	EGDMA 0,98	EGDMA 1,95	EGDMA 3,9	EGDMA 7,8	EGDMA 15,6	EGDMA 31,25	EGDMA 62,5	EGDMA 125	EGDMA 250	EGDMA 500	EGDMA 1000	EGDMA 2000
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	AC 4	AC 8	AC 16	AC 32	AC 64	Blanc

EGDMA = Etilenglicol dimetacrilat (Nr. CAS: 97-90-5) o substanță chimică cu inducție puternică

AC = aldehydă cinamică, referință pozitivă (Nr. CAS: 104-55-2)

Analiza de control al calității trebuie să demonstreze:

- o relație doză-răspuns clară în rândul D, cu $I_{\max} > 20$ ori peste nivelul de bază (în majoritatea cazurilor se ating valori $I_{\max}$ cuprinse între 100 și 300);

- nicio relație doză-răspuns în rândul C și E [nicio valoare de inducție peste 1,5 (în mod ideal, mai mică sau egală cu 1,3)] din cauza unei eventuale contaminări cu lumină, în special lângă godeurile foarte active în rândul EGDMA;
 - nicio diferență semnificativă din punct de vedere statistic între rândurile A, B, C, E, F și G (și anume, fără gradient pentru placa de microtitrare); și
 - variabilitate în oricare dintre rândurile A, B, C, E, F și G și godeurile cu DMSO în rândul H trebuie să fie sub 20 % (și anume, nivel de bază stabil).
-

B.61 Metoda de testare a scurgerii de fluoresceină pentru identificarea substanțelor având un caracter coroziv și un potențial iritant sever la nivel ocular

INTRODUCERE

Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 460 (2012). Metoda de testare a scurgerii de fluoresceină (Fluorescein Leakage – FL) este o metodă de testare *in vitro* care poate fi utilizată, în anumite circumstanțe și cu anumite limite, pentru clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) drept substanțe având un caracter coroziv și un potențial iritant sever, astfel cum sunt definite de Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS) al Organizației Națiunilor Unite (ONU) (categoria 1), de Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ⁽¹⁾ (categoria 1) și de Agenția de protecție a mediului din SUA (EPA) (categoria I) (1) (2). În scopul acestei metode de testare, substanțele cu potențial iritant ocular sever sunt definite drept substanțe chimice care provoacă lezarea tisulară la nivel ocular, în urma administrării substanței chimice de testat, care nu este reversibilă după 21 de zile sau care provoacă o deteriorare fizică gravă a vederii, în timp ce substanțele având un caracter coroziv sunt substanțe chimice care provoacă leziuni tisulare ireversibile la nivel ocular. Aceste substanțe chimice sunt clasificate în categoria 1 din GHS al ONU, categoria 1 din Regulamentul CLP al UE și categoria 1 EPA SUA.

În timp ce metoda de testare FL nu este considerată adecvată pentru a substitui în întregime testul *in vivo* pe ochi de iepure, FL este recomandată pentru a fi inclusă într-o strategie de testare secvențială pentru clasificarea și etichetarea reglementară. Prin urmare, FL este recomandată ca un prim pas în cadrul unei abordări descendente pentru a identifica substanțe având un caracter coroziv/potențial iritant sever, în mod specific pentru tipuri limitate de substanțe chimice (și anume, substanțe solubile în apă și amestecuri) (3) (4).

În prezent, este general acceptat faptul că, în viitorul apropiat, niciun test *in vitro* de iritație oculară nu va fi în măsură să substituie testul ocular *in vivo* [MT B.5 (5)] pentru a efectua estimări în cadrul întregii plaje de valori de iritație pentru diferite clase de substanțe chimice. Cu toate acestea, combinații strategice de mai multe metode de testare alternative în cadrul unei strategii de testare (secvențiale) pot fi în măsură să substituie testul ocular *in vivo* (4). Abordarea descendentă (4) este proiectată pentru a fi utilizată în cazul în care, pe baza informațiilor existente, se preconizează că o substanță chimică are un potențial iritant sever.

Pe baza modelului predictiv detaliat la punctul 35, metoda de testare FL poate identifica substanțe chimice, în cadrul unui domeniu limitat de aplicabilitate, ca substanțe având un caracter coroziv/potențial iritant sever la nivel ocular (categoria 1 din GHS al ONU; categoria din Regulamentul CLP al UE; categoria 1 EPA SUA) fără testare suplimentară. Același lucru este valabil pentru amestecuri, cu toate că în cadrul studiului de validare nu au fost utilizate amestecuri. Prin urmare, metoda de testare FL poate fi utilizată pentru a determina riscul coroziv/iritant la nivel ocular al substanțelor chimice conform strategiei de testare secvențială a MT B.5 (5). Cu toate acestea, o substanță chimică care nu este estimată ca având potențial coroziv sau iritant sever la nivel ocular prin metoda de testare FL necesită testare prin una sau mai multe metode de testare suplimentare (*in vitro* și/sau *in vivo*) capabile să identifice cu precizie i) substanțele chimice care în FL au caracter coroziv/potențial iritant sever *in vitro* fals negativ (categoria 1 din GHS al ONU; categoria 1 din Regulamentul CLP al UE; categoria I EPA SUA); ii) substanțele chimice care nu sunt clasificate pentru corozivitatea/iritația oculară (nicio categorie din GHS al ONU; nicio categorie din Regulamentul CLP al UE; categoria IV EPA SUA); și iii) substanțele chimice care sunt iritanți oculari moderati/ușori (categoriile 2A și 2B din GHS al ONU; categoria 2 din Regulamentul CLP al UE; categoriile II și III EPA SUA).

Scopul acestei metode de testare este de a descrie procedurile utilizate pentru a evalua potențialul coroziv sau iritant sever la nivel ocular al unei substanțe chimice de testat, măsurat prin capacitatea acesteia de a induce leziuni unui monostrat epitelial impermeabil confluent. Integritatea permeabilității transepiteliale este o funcție majoră a unui epiteliu, asemănătoare celei întâlnite la conjunctivă și la corneă. Permeabilitatea transepitelială este controlată de diverse joncțiuni strânse. Creșterea permeabilității epitelului cornean *in vivo* s-a dovedit a fi corelată cu nivelul de inflamație și leziuni de suprafață constatate pe măsură ce iritația oculară se dezvoltă.

În metoda de testare FL, efectele toxice după o expunere scurtă la substanța chimică de testat sunt măsurate printr-o creștere a permeabilității fluoresceinei sodice prin monostratul epitelial al celulelor renale Madin-Darby de câine (MDCK) cultivate pe inserții permeabile. Cantitatea de scurgere de fluoresceină care apare este proporțională cu leziunea provocată de substanța chimică joncțiunilor strânse, joncțiunilor desmozomice și membranelor celulare și poate fi utilizată pentru estimarea potențialului toxicității oculare al unei substanțe chimice de testat. În appendicele 1 prezintă o diagramă a celulelor MDCK cultivate pe o inserție cu membrană pentru metoda de testare FL.

⁽¹⁾ Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353, 31.12.2008, p. 1.

Definițiile sunt prevăzute în apendicele 2.

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITĂRI

Această metodă de testare are la bază protocolul nr. 71 al INVITTOX (6), care a fost evaluat în cadrul unui studiu de validare internațional de către Centrul European pentru validarea metodelor alternative (ECVAM), în colaborare cu Comitetul de Coordonare Interagenții cu privire la validarea metodelor alternative (ICCVAM) al SUA și cu Centrul japonez pentru validarea metodelor alternative (JaCVAM).

Metoda de testare FL nu se recomandă pentru identificarea substanțelor chimice care sunt clasificate ca iritanți ușori/moderați sau a substanțelor chimice care nu sunt clasificate pentru iritație oculară (substanțe și amestecuri) (și anume, cat. 2A/2B, nicio cat. din GHS.; cat. 2, nicio cat. din Regulamentul CLP al UE; cat. II/III/IV EPA SUA), astfel cum a fost demonstrat de studiul de validare (3) (7).

Metoda se aplică numai pentru substanțele chimice solubile în apă (substanțe și amestecuri). Potențialul de iritație oculară severă al substanțelor chimice solubile în apă și/sau în cazul în care efectele toxice nu sunt afectate de diluție este estimat, în general, cu precizie utilizând metoda de testare FL (7). Pentru clasificarea unei substanțe chimice ca fiind solubilă în apă, în condiții experimentale, aceasta trebuie să fie solubilă în soluție salină echilibrată Hanks (HBSS), sterilă, care conține calciu (cu o concentrație de 1,01,8 mM), fără roșu fenol la o concentrație $\geq 250 \mu\text{g/ml}$ (o doză peste limita de 100 mg/ml). Cu toate acestea, în cazul în care substanța chimică de testat este solubilă la o concentrație sub 100 mg/ml, dar deja determină o inducție FL de 20 % la concentrația respectivă (însemnând $\text{FL}_{20} < 100 \text{ mg/ml}$ 100 mg/ml), acesta poate fi clasificată, cu toate acestea, în cat. 1 din GHS. sau cat. I EPA.

Limitele identificate pentru această metodă de testare exclud acizii și bazele puternice, fixatorii de celule și substanțele chimice puternic volatile din domeniul de aplicabilitate. Aceste substanțe chimice au mecanisme care nu sunt măsurate prin metoda de testare FL, de exemplu coagulare extensivă, saponificare sau anumite compoziții chimice reactive. Alte limite identificate pentru această metodă se bazează pe rezultatele pentru capacitatea de estimare pentru substanțe chimice de testat colorate și vâscoase (7). Se sugerează faptul că ambele tipuri de substanțe chimice sunt dificil de îndepărtat din monostrat după perioada de expunere pe termen scurt și că predicțibilitatea metodei de testare ar putea fi îmbunătățită în cazul în care se utilizează un număr mai mare de spălări. Substanțele chimice solide în suspensie în lichid au tendința de a precipita, iar concentrația finală la celule poate fi dificil de determinat. Atunci când substanțele din aceste clase chimice și fizice sunt eliminate din baza de date, precizia FL în ceea ce privește sistemele de clasificare UE, EPA și GHS este îmbunătățită substanțial (7).

Pe baza scopului acestei metode de testare (și anume, identificarea numai a substanțelor cu caracter coroziv/potențial iritant sever la nivel ocular), ratele de rezultate fals negative (a se vedea punctul 13) nu sunt esențiale având în vedere faptul că astfel de substanțe chimice ar fi testate ulterior cu alte teste *in vitro* validate în mod corespunzător sau pe iepuri, în funcție de cerințele de reglementare, utilizând o strategie de testare secvențială cu o abordare având la bază forța probantă a datelor (5) (a se vedea, de asemenea, punctele 3 și 4).

Alte limite identificate ale metodei de testare FL se bazează pe rate de rezultate fals negative și fals pozitive. Atunci când este utilizată ca o etapă inițială în cadrul unei abordări descendente pentru a identifica substanțe și amestecuri solubile în apă având un caracter coroziv/iritant sever la nivel ocular (categoria 1 din GHS al ONU; categoria 1 din Regulamentul CLP al UE; categoria I EPA a SUA) rata de rezultate fals pozitive pentru metoda de testare FL s-a încadrat în plaja de valori de la 7 % (7/103; GHS al ONU și Regulamentul CLP al UE) până la 9 % (9/99; EPA a SUA) și rata de rezultate fals negative s-a încadrat în plaja de valori de la 54 % (15/28; EPA a SUA) până la 56 % (27/48) în comparație cu rezultatele *in vivo*. Grupele chimice care prezintă rezultate fals pozitive și/sau fals negative în metoda de testare FL nu sunt definite în prezentul document.

Anumite limitări tehnice sunt specifice culturii de celule MDCK. Joncțiunile strânse care împiedică trecerea colorantului fluoresceină sodică prin monostrat sunt din ce în ce mai mult compromise de creșterea numărului de pasaje celulare. Formarea incompletă de joncțiuni strânse conduce la creșterea FL în martorul netratat. Prin urmare, o scurgere definită maximă admisă în martorii netratați este importantă (a se vedea punctul 38: scurgere 0 %). La fel ca în cazul tuturor testelor *in vitro*, celulele au potențialul de a se transforma de-a lungul timpului, astfel încât este esențial să se declare intervalele numărului de pasaje pentru teste.

Actualul domeniu de aplicabilitate poate fi mărit în unele cazuri, dar numai după analizarea unui set extins de date din studii pe substanțe chimice de testat, de preferință dobândită prin testare (3). Această metodă de testare va fi actualizată în consecință, pe măsură ce noi informații și date sunt luate în considerare.

Toate laboratoarele care utilizează pentru prima dată această testare trebuie să utilizeze substanțele de verificare menționate în apendicele 3. Laboratoarele pot utiliza respectivele substanțe chimice pentru a demonstra competența tehnică proprie în ceea ce privește efectuarea metodei de testare FL înainte de trimiterea datelor testului FL în scopul clasificării reglementare a pericolelor.

PRINCIPIUL TESTULUI

FL este un test *in vitro* bazat pe citotoxicitate și funcționarea celulei, care se efectuează pe un monostrat confluent de celule MDCK CB997 tubulare epiteliale care sunt cultivate pe inserții semipermeabile și modelează starea neproliferară a epitelii cornean *in vivo*. Linia celulară MDCK este bine stabilită și formează joncțiuni strânse și joncțiuni desmozomice similare celor întâlnite pe latura apicală a epitelilor conjunctivale și corneene. Joncțiunile strânse și cele desmozomice *in vivo* previn pătrunderea soluțiilor și a materiilor străine la nivelul epitelii cornean. Pierderea de impermeabilitate transepitelială, datorită joncțiunilor strânse și joncțiunilor desmozomice deteriorate, este unul dintre primele evenimente ale iritației oculare provocate de substanța chimică.

Substanța chimică de testat se aplică stratului confluent de celule cultivate pe latura apicală a inserției. În mod curent se utilizează o expunere scurtă, de 1 minut, pentru a reflecta rata normală de eliminare la expunerea umană. Un avantaj al expunerii scurte constă în faptul că substanțele și amestecurile pe bază de apă pot fi testate în stare pură, în cazul în care acestea pot fi ușor eliminate după perioada de expunere. Acest lucru permite mai multe comparații directe între rezultate și efectele chimice la oameni. Substanța chimică de testat este ulterior îndepărtată și colorantul fluoresceină sodică netoxic, cu nivel ridicat de fluorescență se adaugă laturei apicale a monostratului timp de 30 de minute. Se determină leziunea provocată de substanța chimică de testat joncțiunilor strânse prin cantitatea de fluoresceină care se scurge prin stratul celular într-o perioadă de timp definită.

Se determină cantitatea de colorant fluoresceină sodică care trece prin monostrat și prin membrana de inserție într-un volum predeterminat de soluție prezentă în godeu (în care se scurge colorantul fluoresceină sodică) prin măsurarea spectrofluorometrică a concentrației de fluoresceină din godeu. Se calculează cantitatea de scurgere de fluoresceină (FL) în funcție de citirile intensității de fluoresceină (FI) din doi martori: un martor alb și un martor pentru scurgerea maximă. Se exprimă procentul de scurgere și, prin urmare, volumul leziunilor la nivelul joncțiunilor strânse, raportat la martorii respectivi, pentru fiecare serie de concentrații de substanță chimică de testat. Ulterior, se calculează FL₂₀ (și anume, concentrația care provoacă 20 % FL față de valoarea înregistrată pentru monostratul confluent netratat și pentru inserțiile fără celule). Valoarea FL₂₀ (mg/ml) se utilizează în modelul predictiv pentru identificarea substanțelor având un caracter coroziv și un potențial iritant sever la nivel ocular (a se vedea punctul 35).

Recuperarea este o parte importantă a profilului de toxicitate al substanței chimice de testat și este evaluată, de asemenea, prin testul *in vivo* de iritație oculară. Analizele preliminare au indicat faptul că datele de recuperare (până la 72 de ore în urma expunerii chimice) ar putea spori capacitatea de estimare din Protocolul 71 al INVITTOX, dar este necesară evaluarea suplimentară și ar beneficia de date suplimentare, obținute, de preferință, prin teste suplimentare (6). Această metodă de testare va fi actualizată în consecință, pe măsură ce noi informații și date sunt luate în considerare.

PROCEDURĂ

Pregătirea monostratului celular

Se pregătește monostratul de celule MDCK CB 997 utilizând celule subconfluente care cresc în flacoane de culturi celulare în DMEM/ amestec de nutrienți F12 [1x concentrat cu L-glutamină, 15 mM HEPES, calciu (cu o concentrație de 1,0-1,8 mM) și 10 % FCS/FBS inactivate la căldură]]. Este important ca toate mediile/soluțiile utilizate în testul FL să conțină calciu cu o concentrație între 1,8 mM (200 mg/l) și 1,0 mM (111 mg/l) pentru a asigura formarea și integritatea joncțiunilor strânse. Se controlează plaja de valori a numărului de pasaje celulare pentru a se asigura formarea de joncțiuni strânse egale și reproductibile. De preferință, celulele trebuie să se încadreze în intervalul de pasaje 3-30 de la decongelare, deoarece celulele care se încadrează în acest interval de pasaje au funcționalitate similară, ceea ce contribuie la obținerea de rezultate reproductibile ale testului.

Înainte de efectuarea metodei de testare FL, celulele se detașează din flacon prin tripsinizare, se centrifughează și o cantitate adecvată de celule se însămânțează în inserțiile plasate în plăci cu 24 de godeuri (a se vedea appendicele 1). Pentru însămânțarea celulelor se utilizează inserții cu diametrul de doisprezece mm cu membrană din amestec de esteri de celuloză, o grosime de 80-150 μm și o dimensiune a porilor de 0,45 μm . În studiul de validare au fost utilizate inserții de 12 mm Millicell-HA. Proprietățile inserției și tipul membranei sunt importante, întrucât acestea pot afecta cultivarea celulelor și legătura chimică. Anumite tipuri de substanțe chimice s-ar putea lega de inserția cu membrană Millicell-HA, fapt care ar putea afecta interpretarea rezultatelor. Substanțele chimice de verificare (a se vedea appendicele 3) se utilizează pentru a demonstra echivalența în cazul în care se utilizează alte membrane.

Legătura chimică de inserția cu membrană este mult mai frecventă în cazul substanțelor chimice cationice precum clorura de benzalconiu, care sunt atrase de membrana încărcată (7). Legătura chimică cu inserția cu membrană poate crește perioada de expunere chimică, conducând la o supraestimare a potențialului toxic al substanței chimice, dar, de asemenea, poate reduce în mod fizic scurgerea de fluoresceină prin inserție, prin legarea colorantului de substanța chimică cationică legată de inserția cu membrană, conducând la o subestimare a potențialului toxic al substanței chimice. Acest lucru poate fi ușor monitorizat prin expunerea membranei singure la concentrația maximă de substanță chimică de testat și ulterior adăugarea colorantului fluoresceină sodică la concentrația normală pentru o perioadă de timp standard (fără martor celular). În cazul în care are loc legătura colorantului fluoresceină sodică, membrana inserției devine galbenă după ce materialul de testat a fost spălat. Prin urmare, este esențial să se cunoască proprietățile de legătură ale substanței chimice de testat pentru a putea interpreta efectul substanței chimice asupra celulelor.

Însămânțarea celulelor pe inserții produce un monostrat confluent la momentul expunerii chimice. Se adaugă $1,6 \times 10^5$ celule la fiecare inserție (400 μl dintr-o suspensie celulară cu o densitate de 4×10^5 celule/ml). În aceste condiții, un monostrat confluent se obține de regulă după 96 de ore în cultură. Se examinează vizual inserțiile înainte de însămânțare, astfel încât să se asigure că orice leziune înregistrată la controlul vizual descris la punctul 30 se datorează manipulării.

Se păstrează în incubatoare culturile celulare MDCK, într-o atmosferă umedă, la $5\% \pm 1\% \text{CO}_2$ și o temperatură de $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Celulele nu trebuie să fie contaminate cu bacterii, virusuri, micoplasmă sau ciuperci.

Aplicarea substanțelor chimice de testat și a celor martor

Pentru fiecare determinare experimentală se pregătește o soluție mamă proaspătă de substanță chimică de testat și se utilizează în termen de 30 de minute de la prepararea acesteia. Se pregătesc substanțele chimice de testat în HBSS care conține calciu (cu o concentrație de 1,0-1,8 mM), fără roșu fenol pentru a evita legarea proteinelor serice. Se evaluează solubilitatea substanței chimice la 250 mg/ml în HBSS înainte de testare. În cazul în care, la această concentrație, substanța chimică formează o suspensie sau o emulsie stabilă (și anume, se menține în mod uniform și nu se decantează sau se separă în mai mult de o fază) timp de 30 minute, HBSS poate fi utilizată în continuare ca solvent. Cu toate acestea, în cazul în care substanța chimică este insolubilă în HBSS la această concentrație, se ia în considerare utilizarea altor metode de testare în loc de FL. Utilizarea uleiului mineral ușor ca solvent în cazurile în care substanța chimică se dovedește a fi insolubilă în HBSS se ia în considerare cu prudență, având în vedere faptul că nu există suficiente date disponibile pentru a extrage concluzii cu privire la performanța testului FL în astfel de condiții.

Toate substanțele chimice se pregătesc în HBSS sterilă, care conține calciu (cu o concentrație de 1,0-1,8 mM), fără roșu fenol din soluția mamă, la cinci concentrații fixe diluate în greutate pe volum: 1, 25, 100, 250 mg/ml și o soluție pură sau saturată. Atunci când se testează o substanță chimică solidă, se include o concentrație foarte ridicată de 750 mg/ml. Această concentrație a substanței chimice ar putea necesita aplicarea pe celulele utilizând o pipetă cu deplasare. În cazul în care toxicitatea se situează între 25 și 100 mg/ml, se testează de două ori următoarele concentrații suplimentare: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. Se obține valoarea FL_{20} din concentrațiile respective cu condiția îndeplinirii criteriilor de acceptare.

Se aplică substanțele chimice de testat la monostraturile celulare confluențe după îndepărtarea mediului de cultură celulară și spălarea de două ori cu HBSS sterilă, caldă (37 °C), care conține calciu (cu o concentrație de 1,0-1,8 mM), fără roșu fenol. Până în prezent, filtrele au fost verificate vizual pentru orice leziune pre-existentă care ar putea fi atribuită în mod fals potențialelor incompatibilități cu substanțele chimice de testat. Se utilizează cel puțin trei replici pentru fiecare concentrație de substanță chimică de testat și pentru martori la fiecare determinare. După expunerea de 1 minut la temperatura camerei, se îndepărtează cu grijă substanța chimică de testat prin aspirație, se spală de două ori monostratul cu HBSS sterilă, caldă (37 °C), care conține calciu (cu o concentrație de 1,01,8 mM), fără roșu fenol și se măsoară imediat scurgerea de fluoresceină.

La fiecare determinare se utilizează martori negativi (MN) și martori pozitivi (MP) testați în paralel pentru a demonstra faptul că integritatea monostratului (MN) și sensibilitatea celulelor (MP) se încadrează într-o plajă definită de valori de acceptare din teste anterioare. Substanța chimică MP recomandată este Brij 35 (Nr. CAS 9002-92-0) la 100 mg/ml. Această concentrație furnizează aproximativ 30 % scurgere de fluoresceină (plajă de valori acceptabile 20-40 % scurgere de fluoresceină, și anume, leziuni la nivelul stratului celular). Substanța chimică MN recomandată este HBSS (netratată, martor alb), care conține calciu (cu o concentrație de 1,0-1,8 mM), fără roșu fenol. La fiecare determinare se include, de asemenea, un martor pentru scurgerea maximă pentru a permite calcularea valorilor FL₂₀. Scurgerea maximă se determină utilizând o inserție martor, fără celule.

Determinarea permeabilității fluoresceinei

Imediat după îndepărtarea substanțelor chimice de testat și martor, se adaugă în inserții (de exemplu, Millicell-HA) 400 μl de 0,1 mg/ml soluție fluoresceină sodică [0,01 % (g/v)] în HBSS care conține calciu (cu o concentrație de 1,0-1,8 mM), fără roșu fenol. Culturile se mențin la temperatura camerei timp de 30 minute. La sfârșitul perioadei de incubare cu fluoresceină, se îndepărtează cu atenție inserțiile din fiecare godeu. Se efectuează controlul vizual pentru fiecare filtru și se înregistrează orice leziune care ar putea să fi avut loc în timpul manipulării.

Se cuantifică cantitatea de fluoresceină care s-a scurs prin monostrat și prin inserție în soluția rămasă în godeuri după îndepărtarea inserțiilor. Se efectuează măsurători cu un spectrofluorimetru la lungimi de undă cu excitație și emisie de 485 nm și respectiv, 530 nm. Se fixează sensibilitatea spectrofluorimetrului astfel încât să existe cea mai mare diferență numerică între nivelul maxim de FL (inserție fără celule) și nivelul minim de FL (inserție cu monostrat confluent tratat cu MN). Din cauza diferențelor în ceea ce privește spectrofluorimetrul utilizat, se sugerează utilizarea unei sensibilități care să furnizeze un nivel de intensitate al fluorescenței > 4000 la martorul cu nivel maxim de scurgere. Valoarea maximă FL nu trebuie să depășească 9999. Intensitatea scurgerii maxime de fluorescență trebuie să se încadreze în plaja de valori lineară a spectrofluorimetrului utilizat.

Interpretarea rezultatelor și modelul predictiv

Cantitatea de FL este proporțională cu leziunile provocate de substanța chimică la nivelul joncțiunilor strânse. Se calculează procentul de FL pentru fiecare concentrație testată de substanță chimică din valorile FL obținute pentru substanța chimică de testat cu referire la valori FL din MN (citire din monostratul confluent de celule tratate cu MN) și un martor cu nivel maxim de scurgere (citire pentru cantitatea de FL printr-o inserție fără celule).

Intensitatea medie a scurgerii maxime de fluorescență = x

Intensitatea medie pentru 0 % scurgere de fluorescență (MN)= y

Se obține valoarea medie pentru 100 % scurgere scăzând valoarea medie pentru 0 % scurgere din valoarea medie maximă de scurgere,

și anume, $x - y = z$

Se obține procentul de scurgere pentru fiecare doză fixă prin scăderea scurgerii de 0 % din intensitatea medie de fluorescență a celor trei citiri replici (m) și împărțind această valoare la scurgerea de 100 % și anume, %FL = [(m-y)/z] x 100 %, unde:

m = intensitatea medie de fluorescență a celor trei măsurători ale replicilor pentru concentrația implicată

%FL = procentul de fluoresceină care se scurge prin stratul celular

Se aplică următoarea ecuație pentru calcularea concentrației substanței chimice care provoacă 20 % FL:

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

Unde:

D = % de inhibare

A = % de lezare (20 % scurgere de fluoresceină)

B = % de scurgere de fluoresceină < A

C = % de scurgere de fluoresceină > A

M_C = Concentrația C (mg/ml)

M_B = Concentrația B (mg/ml)

Valoarea limită a FL₂₀ pentru estimarea substanțelor chimice ca substanțe având un caracter coroziv/potențial iritant sever este prezentată mai jos:

FL ₂₀ (mg/ml)	GHS al ONU C&E	Regulamentul CLP al UE C&E	EPA SUA C&E
≤ 100	Categoria 1	Categoria 1	Categoria I

C&E: clasificare și etichetare

Metoda de testare FL se recomandă doar pentru identificarea substanțelor având un caracter coroziv și un potențial iritant sever la nivel ocular solubile în apă (categoria 1 din GHS al ONU, categoria 1 din Regulamentul CLP al UE, categoria I EPA SUA) (a se vedea punctele 1 și 10).

Pentru a identifica substanțele chimice (substanțe și amestecuri) solubile în apă (3) (6) (7) ca „provocând lezarea oculară gravă” (categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP al UE) sau ca „substanțe cu caracter coroziv sau potențial iritant sever la nivel ocular” (categoria I EPA SUA), substanța chimică de testat trebuie să inducă o valoare FL₂₀ ≤ 100 mg/ml.

Acceptarea rezultatelor

Valoarea medie maximă a scurgerii de fluoresceină (x) trebuie să fie mai mare de 4000 (a se vedea punctul 31), media scurgerii de 0 % (y) trebuie să fie mai mică sau egală cu 300, iar media scurgerii de 100 % (z) trebuie să se situeze între 3700 și 6000.

Un test este considerat acceptabil în cazul în care martorul pozitiv produce leziuni la nivelul stratului celular de la 20 % la 40 % (măsurate în % de scurgere de fluoresceină).

DATE ȘI RAPORTARE

Date

Pentru fiecare determinare se înregistrează, sub formă de tabel, datele obținute pentru fiecare godeu replică (de exemplu, valorile intensității fluorescenței și date cu privire la procente calculate de FL pentru fiecare substanță chimică de testat, inclusiv clasificarea). În plus, se înregistrează valorile medii ± DS ale fiecărei măsurători replică la fiecare determinare.

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanțe chimice de testat și martor

- Denumire (denumiri) chimică(e), precum denumirea structurală utilizată de Chemical Abstracts Service (CAS), urmată de alte denumiri, dacă se cunosc;
- Numărul CAS al substanței chimice, dacă se cunoaște;
- Puritatea și compoziția substanței sau a amestecului [în procent(e) pe greutate], în măsura în care această informație este disponibilă;
- Proprietățile fizico-chimice relevante pentru desfășurarea studiului (de exemplu, starea fizică, volatilitatea, pH-ul, stabilitatea, solubilitatea în apă, clasă chimică);
- Tratamentul la care a fost supusă substanța chimică de testat/martor înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);
- Condiții de depozitare;

Justificarea metodei de testare și a protocolului utilizat

- Trebuie să includă considerații cu privire la domeniul de aplicabilitate și limitările metodei de testare;

Condiții de testare

- Descrierea sistemului celular utilizat, inclusiv certificatul de autenticitate și statusul micoplasmei liniei celulare;
- Detalii privind procedura de testare utilizată;
- Concentrația (concentrațiile) de substanță chimică de testat utilizată(e);
- Durata expunerii la substanța chimică de testat;
- Durata de incubație cu fluoresceină;
- Descrierea oricăror modificări la procedura de testare;
- Descrierea criteriilor de evaluare utilizate;
- Trimiteri la date anterioare ale modelului (de exemplu, martori negativi și pozitivi, substanțe de referință, dacă este cazul);
- Informații cu privire la performanțele tehnice demonstrate de laborator;

Rezultate

- Prezentarea în formă tabelară a datelor cu privire la substanțele chimice de testat și martor individuale pentru fiecare determinare și fiecare măsurătoare a unei replici (inclusiv rezultate individuale, valori medii și DS);
- Clasificarea (clasificările) derivată(e), cu trimitere la modelul predictiv și/sau criteriile de decizie utilizate;
- Descrierea altor efecte observate;

Discutarea rezultatelor

- Trebuie să includă considerații cu privire la un rezultat neconcludent (punctul 35: FL₂₀ > 100 mg/ml) și testarea suplimentară.

Concluzii

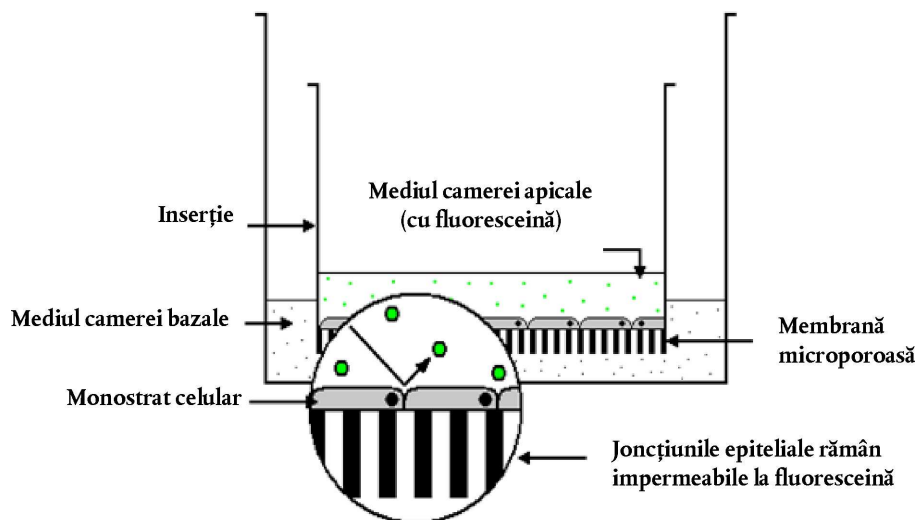
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponibil la: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]
 - (2) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.
 - (3) EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.
 - (4) Scott, L. *et al.* (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9
 - (5) Capitolul B.5 din prezenta anexă, *Toxicitate acută: iritație/ corозиune oculară*
 - (6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Disponibil la: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>]
 - (7) EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.
 - (8) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris.
-

Apendicele 1

DIAGRAMA CELULELOR MDCK CULTIVATE PE O INSERȚIE CU MEMBRANĂ PENTRU METODA DE TESTARE FL

Se cultivă un strat confluent de celule MDCK pe membrana semipermeabilă a unei inserții. Se introduc inserțiile în godeurile plăcilor de microtitrare cu 24 de godeuri.



Figură preluată din: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.

Apendicele 2

DEFINIȚII

Precizie: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele „relevanței” acesteia. Termenul este deseori utilizat în paralel cu termenul „concordanță” pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Categoria I EPA: Substanțe chimice care produc implicație corozivă (distrugerea ireversibilă a țesutului ocular) sau corneană sau iritație care persistă mai mult de 21 de zile (2).

Regulamentul CLP al UE: [Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor]: Pune în aplicare în Uniunea Europeană (UE) GHS al ONU de clasificare a substanțelor chimice (substanțe și amestecuri).

Rată de rezultate fals negative: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind negative. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Rată de rezultate fals pozitive: Proporția tuturor substanțelor chimice negative identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind pozitive. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

FL₂₀: Poate fi estimată prin determinarea concentrației la care substanța chimică testată provoacă 20 % scurgere de fluoresceină prin stratul celular.

Scurgere de fluoresceină: Cantitatea de fluoresceină care trece prin stratul celular, măsurată cu ajutorul unui spectrofluorimetru.

GHS [Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Națiunilor Unite (ONU)]: Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, de sănătate și de mediu și care abordează elemente de comunicare corespunzătoare, precum pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de siguranță astfel încât să transmită informații cu privire efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului.

Categoria 1 GHS: Producerea de leziuni tisulare la nivel ocular sau deteriorarea fizică gravă a vederii în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care nu este complet reversibilă într-un interval de 21 de zile de la aplicare.

Pericol: Proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, un sistem sau o (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

Amestec: Utilizat în contextul GHS al ONU ca însemnând un amestec sau o soluție compusă din două sau mai multe substanțe care nu intră în reacție.

Martor negativ: O probă replică netratată care conține toate componentele sistemului de testare. Această probă este analizată împreună cu probele tratate cu substanța chimică de testat și cu alte probe martor pentru a determina dacă solventul interacționează cu sistemul de testare.

Neclasificat: Substanțe care nu sunt clasificate în categoriile 1, 2A sau 2B din GHS al ONU; categoriile 1 sau 2 din Regulamentul CLP al UE; sau categoriile I, II sau III de iritanți oculari EPA SUA.

Substanță având un caracter coroziv la nivel ocular: (a) O substanță chimică care provoacă leziuni tisulare ireversibile la nivel ocular. (b) Substanțe chimice sunt clasificate în categoria 1 din GHS al ONU; categoria 1 din Regulamentul CLP al UE; sau categoria I EPA SUA.

Iritant ocular: (a) O substanță chimică care provoacă o modificare reversibilă la nivel ocular în urma aplicării pe suprafața anterioară a ochiului; (b) Substanțe chimice clasificate în categoriile 2A sau 2B din GHS al ONU; categoria 2 din Regulamentul CLP al UE; sau categoriile II sau III de iritanți oculari EPA SUA.

Substanță cu potențial iritant sever: (a) O substanță care provoacă lezarea tisulară la nivel ocular după aplicarea pe suprafața anterioară a ochiului, care nu este reversibilă după 21 de zile de la aplicare sau care provoacă o deteriorare fizică gravă a vederii; (b) Substanțe chimice clasificate în categoria 1 din GHS al ONU; categoria 1 din Regulamentul CLP al UE; sau categoria I EPA SUA.

Martor pozitiv: O replică ce conține toate componentele unui sistem de testare și care a fost tratată cu o substanță chimică cunoscută pentru faptul că provoacă o reacție pozitivă. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a răspunsului martorului pozitiv, amplitudinea răspunsului pozitiv nu trebuie să fie extremă.

Substanțe chimice de verificare: Un subset al listei de substanțe chimice de referință care pot fi utilizate de un laborator naiv pentru a demonstra performanțele cu metoda de testare de referință validată.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop specific. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară și prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include luarea în considerare a acurateței (conformității) unei metode de testare (8).

Fiabilitate: Măsură în care o metodă de testare poate fi reprodusă în mod reproductibil, în același laborator sau în laboratoare diferite în timp, atunci când sunt efectuate utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau inter-laboratoare.

Test substitutiv: Un test conceput să substituie un test care este în utilizare sistemică și acceptat pentru identificarea pericolelor și/sau evaluarea riscurilor și care a fost stabilit pentru a furniza o protecție echivalentă sau îmbunătățită a sănătății umane sau a animalelor sau a mediului, după caz, comparativ cu testul acceptat, pentru toate situațiile de testare și substanțele chimice posibile.

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect în urma testului. Acesta permite măsurarea preciziei unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (8).

Lezarea oculară gravă: Reprezintă producerea de leziuni tisulare la nivel ocular sau deteriorarea fizică gravă a vederii în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care nu este complet reversibilă într-un interval de 21 de zile de la aplicare.

Martor solvent/vehicul: O probă netratată care conține toate componentele unui sistem de testare, inclusiv solventul sau vehiculul analizat împreună cu substanța chimică de testat tratată și cu alte probe martor pentru a stabili reacția de bază pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată în același solvent sau vehicul. Atunci când este testată în paralel cu un martor negativ, această probă indică, de asemenea, dacă solventul sau vehiculul interacționează cu sistemul testat.

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect în urma testului. Acesta permite măsurarea preciziei unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare.

Substanță: Utilizată în contextul GHS al ONU ca elementele chimice și compușii acestora în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a menține stabilitatea produsului și orice impuritate rezultată din procesul utilizat, dar cu excepția oricărui solvent care poate fi separat fără a afecta stabilitatea substanței sau fără a-i schimba compoziția.

Substanță chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare.

Strategie de testare secvențială: O strategie de testare pe etape în care toate informațiile existente cu privire la o substanță chimică de testat sunt revizuite, într-o anumită ordine, utilizând un proces al forței probante a datelor în fiecare etapă pentru a determina dacă sunt disponibile suficiente informații pentru o decizie privind clasificarea pericolelor înainte de a trece la etapa următoare. În cazul în care potențialul iritant al unei substanțe chimice de testat poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, nu este necesară o testare suplimentară. În cazul în care potențialul iritant al unei substanțe chimice de testat nu poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, se efectuează o procedură de testare secvențială pe animale până în momentul în care se poate realiza o clasificare lipsită de echivoc.

Metodă de testare validată: O metodă de testare pentru care au fost finalizate studii de validare pentru a determina relevanța (inclusiv precizia) și fiabilitatea pentru un anumit scop. Este important de semnalat faptul că este posibil ca performanțele unei metode de testare validate să nu fie suficiente din punct de vedere al acurateței și fiabilității astfel încât aceasta să fie considerată acceptabilă pentru scopul propus (8).

Forța probantă a datelor: Procesul prin care se iau în considerare punctele tari și punctele slabe ale unor informații diverse pentru a se formula și a se susține o concluzie în ceea ce privește potențialul de pericol al unei substanțe chimice de testat.

Apendicele 3

SUBSTANȚE CHIMICE DE VERIFICARE PENTRU METODA DE TESTARE FL

Înainte de utilizarea sistematică a acestei metode de testare, laboratoarele trebuie să demonstreze performanțele tehnice proprii prin identificarea corectă a clasificării coroziei oculare pentru cele 8 substanțe chimice recomandate în tabelul 1. Substanțele respective au fost selectate pentru a reprezenta intervalul răspunsurilor pentru iritația/corozia locală oculară, care se bazează pe rezultatele din testul *in vivo* pe ochi de iepure [TG 405, MT B.5 (5)] (și anume, categoriile 1, 2A, 2B sau „nicio categorie” în conformitate cu GHS al ONU. Cu toate acestea, ținând cont de utilitatea validată a testului FL (și anume, identificarea numai a substanțelor care au un caracter coroziv/potențial iritant sever la nivel ocular), există numai două rezultate ale testelor destinate clasificării (coroziv/iritant sever sau necoroziv/fără potențial iritant sever) pentru a demonstra performanțele. Alte criterii de selecție au fost disponibilitatea comercială a substanțelor chimice, disponibilitatea datelor de referință *in vivo* de calitate superioară și existența datelor de calitate superioară furnizate de metoda de testare FL. Din acest motiv, substanțele chimice de verificare au fost selectate din „documentul de revizuire a fondului pentru testul de scurgere de fluoresceină ca metodă alternativă de testare pentru iritația oculară” (8), care a fost utilizat pentru validarea retrospectivă a metodei de testare FL.

Tabelul 1

Substanțe chimice recomandate pentru demonstrarea performanțelor tehnice prin FL

Substanță chimică	Nr. CAS	Clasă chimică ⁽¹⁾	Formă fizică	Clasificare <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Clasificare <i>in vitro</i> ⁽³⁾
Clorură de ben-zalconiu (5 %)	8001-54-5	Compus de tip onium	Lichid	Categoria 1	Coroziv/Iritant sever
Clorhidrat de prometazină	58-33-3	Amină/ amidă, heterociclic, compus organic de sulf	Solid	Categoria 1	Coroziv/Iritant sever
Hidroxid de sodiu (10 %)	1310-73-2	Alcalină	Lichid	Categoria 1	Coroziv/Iritant sever
Lauril sulfat de sodiu (15 %)	151-21-3	Acid carboxilic (sare)	Lichid	Categoria 1	Coroziv/Iritant sever
4-carboxi-benzaldehidă	619-66-9	Acid carboxilic, aldehydă	Solid	Categoria 2 (A)	Necoroziv/Fără potențial iritant sever
Nitrat de amoniu	6484-52-2	Sare anorganică	Solid	Categoria 2 (A)	Necoroziv/Fără potențial iritant sever
Etil-2-metil-ace-toacetat	609-14-3	Cetonă, ester	Lichid	Categoria 2 (B)	Necoroziv/Fără potențial iritant sever
Glicerol	56-81-5	Alcool	Lichid	Nicio categorie	Necoroziv/Fără potențial iritant sever

Abrevieri: Nr. CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service

⁽¹⁾ Clasele chimice au fost desemnate pentru fiecare substanță chimică de testat prin utilizarea unei scheme de clasificare standard, pe baza sistemului de clasificare al National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (disponibil la <http://www.nlm.nih.gov/mesh>)

⁽²⁾ Pe baza rezultatelor din testul *in vivo* pe ochi de iepure (OCDE TG 405, MT B.5) și prin utilizarea GHS al ONU și a Regulamentului CLP al UE.

⁽³⁾ Pe baza rezultatelor obținute cu FL [Protocolul nr. 71(6) INVITTOX]

B.62 Testul Comet *in vivo* pe celule alcaline de mamifere

INTRODUCERE

Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 460 (2016). Testul Comet *in vivo* alcalin (electroforeză în gel pe celule izolate) (denumit în continuare simplu „testul comet”) este utilizat pentru detectarea întreruperilor lanțului ADN în celule sau nuclee unice de la mai multe țesuturi de animale, de regulă rozătoare, care au fost expuse la material (materiale) cu potențial genotoxic. Testul Comet a fost revizuit și recomandări au fost publicate de către diferite grupuri de experți (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9) (10). Această metodă de testare este parte a unei serii de metode de testare cu privire la toxicologia genetică. A fost elaborat un document al OCDE care oferă informații succinte privind testarea pentru toxicologia genetică (11) și care trece în revistă modificările efectuate recent asupra orientărilor respective.

Scopul testului Comet este de a identifica substanțele chimice care provoacă lezarea ADN-ului. În condiții alcaline (pH >13), testul Comet poate detecta întreruperi simple sau duble ale lanțului, care rezultă, de exemplu, din interacțiuni directe cu ADN-ul, situsuri labile alcaline sau ca o consecință a întreruperilor tranzitorii ale lanțului ADN rezultate în urma procesului de reparare prin excizie a ADN-ului. Aceste întreruperi ale lanțului pot fi reparate, având ca rezultat lipsa efectelor persistente, pot fi letale pentru celulă sau pot fi fixate pe o mutație având ca rezultat o schimbare viabilă permanentă. Acestea pot conduce, de asemenea, la lezarea cromozomială care este asociată, de asemenea, cu numeroase boli umane, inclusiv cancerul.

Un studiu de validare formală a testului Comet *in vivo* pe rozătoare a fost efectuat în perioada 2006-2012, sub coordonarea Centrului japonez pentru validarea metodelor alternative (JaCVAM), în colaborare cu Centrul European pentru validarea metodelor alternative (ECVAM), Comitetul de coordonare Interagenții pentru validarea metodelor alternative (ICCVAM) și Programul Național de toxicologie (NTP) al Centrului Interagenții pentru evaluarea metodelor toxicologice alternative (NICEATM) (12). Această metodă de analiză include utilizarea și limitările recomandate testului Comet și se bazează pe protocolul final (12) utilizat în studiul de validare, precum și pe date suplimentare relevante publicate și nepublicate (aflate în proprietatea laboratoarelor).

Definițiile termenilor cheie sunt prevăzute în apendicele 1. Este de remarcat faptul că mai multe platforme diferite pot fi utilizate pentru acest test (lame de microscop, spoturi în gel, plăci cu 96 de godeuri etc.). Din motive de simplitate, în restul prezentului document se utilizează termenul „lamă”, dar acesta cuprinde toate celelalte platforme.

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITĂRI

Testul Comet este o metodă de măsurare a întreruperilor lanțului ADN la celulele eucariote. Celulele/nucleele izolate integrate în agaroză pe o lamă se lizează cu detergent și o concentrație ridicată de sare. Această etapă de liză digeră membranele celulare și nucleare și permite eliberarea de bucle încolăcite de ADN, denumite în general nucleotide și fragmente de ADN. Electroforeza la pH ridicat are ca rezultat structuri asemănătoare cu o cometă, care, prin utilizarea colorării corespunzătoare cu fluoresceină, pot fi observate prin microscopie cu fluorescență; fragmentele de ADN migrează de la „capăt” la „coadă” în funcție de dimensiunile acestora și intensitatea cozii cometei în raport cu intensitatea totală (cap plus coadă) reflectă valoarea întreruperii ADN-ului (13) (14) (15).

Testul Comet *in vivo* alcalin este relevant în special pentru evaluarea pericolelor genotoxice prin faptul că răspunsurile testului sunt dependente de ADME (absorbție, distribuție, metabolism și excreție) *in vivo* și, de asemenea, de procesele de regenerare de ADN. Acestea pot să varieze între specii, între țesuturi și între tipurile de lezare la nivel de ADN.

Pentru a îndeplini cerințele în materie de bunăstare a animalelor, în special reducerea utilizării animalelor [principiile 3R – înlocuire, reducere, rafinare (replacement, reduction, refinement)], acest test poate fi integrat, de asemenea, în alte studii toxicologice, de exemplu studii de toxicitate cu doze repetate (10) (16) (17), sau criteriul final poate fi combinat cu alte criterii finale de genotoxicitate precum testul *in vivo* de micronucleu pe eritrocite de mamifere (18) (19) (20). Testul Comet este cel efectuat mai adesea la rozătoare, însă a fost aplicat și altor specii de mamifere și nemamifere. Utilizarea speciilor de nerozătoare trebuie să fie justificată din punct de vedere științific și etic, de la caz la caz și se recomandă cu fermitate ca testul Comet să se efectueze asupra altor specii decât rozătoarele numai ca parte a unui alt studiu de toxicitate și nu ca un test independent.

Selecția căii de expunere și a țesutului (țesuturilor) care urmează să fie studiat(e) se determină pe baza tuturor cunoștințelor disponibile/existente cu privire la substanțele chimice de testat, de exemplu, calea de expunere umană destinată/anticipată, metabolismul și distribuția, potențialul de efecte la punctul de contact, alerte structurale, alte date cu privire la genotoxicitate și toxicitate și scopul studiului. Prin urmare, după caz, potențialul genotoxic al substanțelor chimice de testat poate fi testat în țesutul (țesuturile) țintă cu efecte carcinogene și/sau alte efecte toxice. Testul este considerat util, de asemenea, la investigarea suplimentară a genotoxicității detectate printr-un sistem *in vitro*. Efectuarea unui test Comet *in vivo* pe un țesut de interes este necesară atunci când se așteaptă în mod rezonabil ca țesutul de interes să fie expus în mod adecvat.

Testul a fost validat în mod extensiv pentru țesuturi somatice de șobolani masculi în cadrul unor studii în colaborare precum studiul JaCVAM (12) și Rothfuss *et al.*, 2010 (10). În studiul internațional de validare JaCVAM, a fost utilizat ficat și stomac. Ficatul, deoarece este cel mai activ organ în ceea ce privește metabolismul substanțelor chimice și, de asemenea, în mod frecvent, un organ țintă pentru carcinogenitate Stomacul, în primul rând pentru că, de regulă, acesta este primul punct de contact pentru substanțele chimice după expunerea orală, cu toate că și alte domenii ale tractului gastrointestinal precum duodenul și jejunul se iau în considerare, de asemenea, ca țesuturi punct de contact și pot fi considerate mai relevante pentru oameni decât stomacul glandular de rozătoare. Se acordă atenție deosebită pentru a se asigura că astfel de țesuturi nu sunt expuse la concentrații prea ridicate de substanță chimică de testat (21). Tehnica se aplică, în principiu, pentru toate țesuturile din care pot fi derivate suspensii cu celule/nuclee unice. Datele care fac obiectul unui drept de proprietate al mai multor laboratoare demonstrează aplicarea cu succes a acestora la mai multe țesuturi diferite și există mai multe publicații care arată aplicabilitatea tehnicii la organe sau țesuturi, altele decât ficat și stomac, de exemplu jejun (22), rinichi (23)(24), piele (25) (26)sau vezică urinară (27)(28), lavaj de celule din plămâni și branhoalveole (relevante pentru studii asupra substanțelor chimice inhalate) (29) (30) și au fost efectuate teste, de asemenea, în mai multe organe (31) (32).

Cu toate că poate exista un interes cu privire la efectele genotoxice în celule germinale, se remarcă faptul că testul Comet alcalin standard, astfel cum este descris în prezenta metodă de testare, nu este considerat adecvat pentru măsurarea întreruperilor lanțului ADN în celule germinale mature. Având în vedere faptul că au fost raportate niveluri de fond ridicate și variabile de lezare a ADN-ului într-o revizuire a literaturii de specialitate cu privire la utilizarea testului Comet pentru genotoxicitatea celulelor germinale (33), se consideră necesară efectuarea de modificări de protocol, împreună cu îmbunătățirea studiilor de standardizare și validare înainte de includerea în metoda de testare a testului Comet pe celule germinale mature (de exemplu, spermatozoidul). În plus, regimul de expunere recomandat descris în această metodă de testare nu este optim și ar fi necesari timpi de expunere sau perioade de prelevare mai lungi pentru o analiză pertinentă a întreruperilor lanțului ADN în spermatozoizii maturi. În referințele bibliografice au fost descrise efectele genotoxice astfel cum au fost măsurate prin testul Comet pe celule testiculare în diferite etape de diferențiere (34) (35). Cu toate acestea, se remarcă faptul că gonadele conțin un amestec de celule somatice și germinale. Din acest motiv, rezultate pozitive în întreaga gonadă (testicul) nu reflectă în mod necesar leziunea la nivelul celulei germinale; totuși, acestea indică faptul că substanța (substanțele) chimică (e) de testat și/sau metabolizii acesteia (acestora) a (au) ajuns la gonadă.

Legăturile încrucișate nu pot fi detectate în mod fiabil în condițiile experimentale standard ale testului Comet. În anumite condiții experimentale modificate, legăturile încrucișate ADN- ADN și ADN-proteină și alte modificări de bază precum bazele oxidate ar putea fi detectate (23) (36) (37) (38) (39). Cu toate acestea, ar fi necesare lucrări suplimentare pentru a caracteriza în mod corespunzător modificările necesare de protocol. Prin urmare, detectarea agenților de formare a legăturilor încrucișate nu este scopul principal al testului astfel cum este descris în prezenta metodă de testare. Testul nu este adecvat, inclusiv cu modificări, pentru detectarea substanțelor aneugene.

Având în vedere stadiul actual al cunoștințelor, mai multe limitări suplimentare (a se vedea appendicele 3) sunt asociate cu testul Comet *in vivo*. Se preconizează faptul că metoda de testare va fi verificată în viitor și, în cazul în care este necesar, va fi revizuită ținând cont de experiența acumulată.

Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare destinat, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

PRINCIPIUL METODEI

Animalele se expun la substanța chimică de testat printr-o cale de expunere corespunzătoare. La punctele 36-40 se prezintă o descriere detaliată a dozării și a prelevării de probe. La perioada (perioadele) de prelevare de probe selecționată(e), se disecă țesuturile de interes și se prepară suspensiile de celule/nuclee unice (se poate efectua perfuzarea *in situ* în cazul în care se consideră util, de exemplu, ficat) și se acoperă în agar moale astfel încât acestea să fie imobilizate pe lame. Se tratează celule/nucleele cu tampon de lizare pentru a îndepărta membrana celulară și/sau nucleară și se expun la alcalinitate puternică, de exemplu $\text{pH} \geq 13$ pentru a permite corectarea ADN-ului și eliberarea buclelor și fragmentelor de ADN destins. Se supune ulterior electroforezei ADN-ului nuclear în agar. Moleculele de ADN normale nefragmentate rămân în poziția în care ADN-ul nuclear a fost în agar, în timp ce orice buclă de ADN fragmentată sau destinsă ar migra spre anod. După electroforeză, se vizualizează ADN-ul prin utilizarea colorării fluorescente corespunzătoare. Se analizează preparatele utilizând un microscop și sisteme de analiză a imaginii complete sau semiautomate. Cantitatea de ADN care a migrat în timpul electroforezei și distanța de migrare reflectă cantitatea și mărimea fragmentelor de ADN. Există mai multe criterii finale pentru testul Comet. Conținutul de ADN la coadă (% ADN la coadă sau % de intensitate în coadă) a fost recomandat pentru evaluarea leziunilor ADN-ului (12) (40) (41) (42). După analiza unui număr suficient de nuclee, se analizează datele cu ajutorul unor metode adecvate pentru a evalua rezultatele testării.

Se remarcă faptul că modificarea diferitelor aspecte ale metodologiei, inclusiv pregătirea probelor, condițiile de electroforeză, parametrii analizei vizuale (de exemplu, intensitatea colorației, intensitatea luminii becului de la microscop și utilizarea filtrelor de microscop și dinamică camerei) și condițiile ambiante (de exemplu, iluminatul de fundal), au fost investigate și acestea pot afecta migrarea ADN-ului (43) (44) (45) (46).

VERIFICAREA COMPETENȚEI LABORATORULUI

Fiecare laborator trebuie să își stabilească competența experimentală în testul Comet prin demonstrarea capacității de a obține suspensii de celule sau nuclee unice de o calitate suficientă pentru fiecare țesut (țesuturi) țintă pentru fiecare specie utilizată. Se va evalua mai întâi calitatea preparatelor prin % de ADN la coadă pentru animalele tratate cu un vehicul care se încadrează într-un interval de reproductibilitate scăzut. Datele actuale sugerează faptul că media pentru % de ADN la coadă pe grup (pe baza mediei valorilor medii – a se vedea punctul 57 pentru detalii cu privire la acești termeni) pentru ficatul de șobolan nu trebuie să depășească, de preferință, 6 %, valoare care ar fi în concordanță cu valorile din procesul de validare JaCVAM (12) și din alte date care fac obiectul unui drept de proprietate și publicate. Nu există suficiente date la acest moment pentru a face recomandări cu privire la plaje de valori optime sau acceptabile pentru alte țesuturi. Acest lucru nu exclude utilizarea altor țesuturi, în cazul în care acest lucru este justificat. Raportul de testare ar trebui să furnizeze revizuirea corespunzătoare a efectuării testului Comet pe țesuturile respective în comparație cu literatura de specialitate publicată sau cu date care fac obiectul unui drept de proprietate. În primul rând, este de dorit un interval scăzut de % de ADN la coadă în martori pentru a furniza un interval dinamic pentru a detecta un rezultat pozitiv. În al doilea rând, fiecare laborator trebuie să fie capabil să reproducă răspunsuri preconizate pentru mutageni și promutageni direcți cu modalități diferite de acțiune, astfel cum se sugerează în tabelul 1 (punctul 29).

Se pot selecta substanțe pozitive, de exemplu din studiul de validare JaCVAM (12) sau din alte date publicate (a se vedea punctul 9), dacă este cazul, cu justificare și demonstrând răspunsuri clar pozitive pentru țesuturile de interes. Se demonstrează, de asemenea, capacitatea de detectare a efectelor slabe a mutagenilor cunoscuți, de exemplu EMS la doze mici, de exemplu, prin stabilirea de relații doză-răspuns cu numere și spațiere de doze corespunzătoare. Eforturile inițiale se concentrează pe stabilirea competenței pentru țesuturile utilizate cel mai frecvent, de exemplu, ficatul de rozătoare, în cazul în care se poate efectua comparația cu datele existente și cu rezultatele preconizate (12). Date de la alte țesuturi, de exemplu stomac/duoden/jejun/sânge etc., ar putea fi colectate concomitent. Laboratorul trebuie să demonstreze competență pentru fiecare țesut individual de la fiecare specie pe care intenționează să o studieze și va trebui să demonstreze că un răspuns pozitiv acceptabil cu un mutagen cunoscut (de exemplu, EMS) poate fi obținut în țesutul respectiv.

Se colectează date cu privire la martorii negativi/vehicul astfel încât să se demonstreze reproductibilitatea răspunsurilor de date negative și să se asigure faptul că aspectele tehnice ale testului au fost controlate în mod corespunzător sau să se sugereze necesitatea de restabilire a unor plaje de valori cu privire la martorii anteriori (a se vedea punctul 22).

Se remarcă faptul că, în timp ce țesuturi multiple pot fi colectate la necropsie și prelucrate pentru testul Comet, laboratorul trebuie să fie competent în recoltarea de țesuturi multiple de la un singur animal, asigurându-se astfel că nu se omit eventualele leziuni ale ADN-ului și nu se compromite analiza Comet. Durata de timp de la eutanasiere până la îndepărtarea țesuturilor pentru procesare poate fi esențială (a se vedea punctul 44).

Bunăstarea animalelor trebuie luată în considerare în timp ce se dezvoltă în competența în acest test și, prin urmare, se pot utiliza țesuturi prelevate de la animale utilizate în alte teste atunci când se dezvoltă competența în diferite aspecte ale testului. În plus, este posibil să nu fie necesară efectuarea unui studiu complet pe parcursul etapelor de elaborare a unei noi metode de testare într-un laborator și un număr mai mic de animale și concentrații de testare poate fi utilizat atunci când se dezvoltă competențele necesare.

Date privind martorii testați anterior

În cursul verificărilor de competență, laboratorul trebuie să elaboreze o bază de date colectate anterior pentru a stabili plaje de valori și distribuții martor pozitiv și negativ pentru țesuturile și speciile relevante. În referințele bibliografice pot fi consultate recomandări cu privire la modul de a elabora și de a utiliza datele colectate anterior (și anume, criteriile de includere și de excludere a datelor din datele colectate anterior și criteriile de acceptabilitate pentru un anumit experiment) (47). Țesuturile diferite și speciile diferite, precum și vehiculele și căile de administrare diferite pot furniza valori procentuale diferite de ADN la coadă ale martorului negativ. Prin urmare, este important să se stabilească plaje de valori pentru martorul negativ pentru fiecare țesut și specii. Laboratoarele trebuie să utilizeze metode de control al calității, cum ar fi grafice de control [de exemplu, diagrame C sau X-bar (48)], pentru a identifica gradul de variabilitate al datelor lor și pentru a dovedi faptul că metodologia se află „sub control” în respectivul laborator. Selecția substanțelor martor pozitiv, a intervalelor de dozare și a condițiilor experimentale (de exemplu, condiții de electroforeză) corespunzătoare poate necesita optimizare, de asemenea, pentru detectarea efectelor slabe (a se vedea punctul 17).

Orice modificare la protocolul experimental se ia în considerare în ceea ce privește coerența acestuia cu bazele de date privind martorii testați anterior existente ale laboratorului. Orice inconsecvență majoră trebuie să conducă la stabilirea unei noi baze de date privind martorii testați anterior.

DESCRIEREA METODEI

Pregătiri

Selecția speciilor de animale

În mod normal, se utilizează șușe comune de laborator de la rozătoare sănătoase, tinere, adulte (6-10 săptămâni la începutul tratamentului, cu toate că sunt acceptabile, de asemenea, animale puțin mai în vârstă). Alegerea speciilor de rozătoare se bazează pe (i) speciile utilizate în alte studii de toxicitate (pentru a putea corela datele și de a permite studii integrate), (ii) speciile care au dezvoltat tumori într-un studiu de carcinogenitate (atunci când se analizează mecanismul carcinogenezei) sau (iii) speciile cu metabolismul cel mai relevant pentru oameni, dacă se cunoaște. În mod obișnuit, pentru acest test se utilizează șobolani. Cu toate acestea, se pot utiliza alte specii în cazul în care se furnizează justificarea etică și științifică.

Condiții de adăpostire și de hrănire a animalelor

În cazul rozătoarelor, temperatura din camera experimentală trebuie să fie în mod ideal de 22 °C ($\pm$ 3 °C). În mod ideal, umiditatea relativă trebuie să fie de 50-60 %, fiind cel puțin 30 % și să nu depășească, de preferință, 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Spațiul se iluminează artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Alegerea regimului alimentar poate fi influențată de necesitatea de a asigura o proporție adecvată de substanță chimică de testat în cazul alegerii acestei căi de administrare. Rozătoarele se adăpostesc în grupuri mici (în general, nu mai mult de cinci) de același sex, în cazul în care nu se preconizează niciun comportament agresiv. Animalele pot fi adăpostite individual în cazul în care acest lucru este justificat din punct de vedere științific. Se utilizează podele solide ori de câte ori este posibil deoarece podelele din plasă pot cauza leziuni grave (49). Se furnizează îmbogățirea adecvată a mediului de viață.

Pregătirea animalelor

Se distribuie animalele în mod aleatoriu în grupe martor și grupe de tratament. Se identifică în mod individual animalele și se aclimatizează la condițiile de laborator timp de cel puțin cinci zile înainte de începerea tratamentului. Se utilizează metoda cea mai puțin invazivă de identificare unică a animalelor. Metodele corespunzătoare includ aplicarea de inele, crotalierea, microciparea și identificarea biometrică. Secționarea degetului și a urechii nu sunt justificate din punct de vedere științific în cadrul acestor teste. Cuștile se dispun astfel încât posibilele efecte datorate amplasării acestora să fie reduse la minim. La începutul studiului, variația greutateii animalelor trebuie să fie minimă și să nu depășească $\pm 20\%$.

Pregătirea dozelor

Substanțele chimice de testat solide se dizolvă sau se suspendă în vehicule corespunzătoare sau se amestecă în hrana sau apa de băut înainte de administrarea la animale. Substanțele chimice de testat în stare lichidă se pot administra direct sau se pot dilua înainte de administrare. Pentru expuneri prin inhalare, substanțele chimice de testat se administrează sub formă de gaz, vapori sau un aerosol solid/lichid, în funcție de proprietățile fizico-chimice ale acestora (50) (51).

Se utilizează preparate proaspete de substanță chimică de testat, cu excepția cazului în care datele de stabilitate demonstrează caracterul acceptabil al depozitării și definesc condiții de depozitare corespunzătoare.

Condiții de testare

Vehicul

Vehiculul nu trebuie să producă efecte toxice la volumele dozelor utilizate și nu trebuie să existe suspiciunea reacției chimice a acestuia cu substanțele chimice de testat. În cazul în care se utilizează alte vehicule decât cele recunoscute, includerea acestora necesită justificare prin date de referință care să indice compatibilitatea acestora în ceea ce privește animalele de experiență, calea de administrare și criteriul final. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare mai întâi utilizarea unui solvent/vehicul apos. Se remarcă faptul că unele vehicule (în special vehiculele în stare vâscoasă) pot provoca inflamații și pot crește nivelurile de fond ale întreruperilor lanțului ADN la punctul de contact, în special la administrări multiple.

Martori

Martori pozitivi

La acest moment, în fiecare test se include un grup de minim 3 animale analizabile de același sex sau din fiecare sex, în cazul în care se utilizează ambele sexe (a se vedea punctul 32), tratate cu o substanță martor pozitiv. În viitor, ar putea fi posibil să se demonstreze performanța adecvată pentru a reduce necesitatea de martori pozitivi. În cazul în care se utilizează mai multe perioade de prelevare (de exemplu, cu un singur protocol de administrare), este necesară includerea de martori pozitivi doar în una dintre perioadele de prelevare, dar se asigură un model echilibrat (a se vedea punctul 48). Nu este necesar să se administreze substanțe martor pozitiv testate în paralel pe aceeași cale precum substanța chimică de testat, cu toate că este importantă utilizarea aceleiași căi la măsurarea efectelor punctului de contact. Pentru substanțele martor pozitiv, trebuie să se demonstreze că acestea generează întreruperi ale lanțului ADN în toate țesuturile de interes pentru substanța chimică de testat, iar EMS este susceptibil de a fi martorul pozitiv selectat, întrucât aceasta a provocat întreruperi ale lanțului ADN în toate țesuturile care au fost studiate. Se selectează dozele de substanțe martor pozitive astfel încât să producă efecte moderate care evaluează în mod critic performanța și sensibilitatea testului și ar putea să se bazeze pe curbele doză-răspuns stabilite de laborator în cursul demonstrației de competență. Procentul de ADN la coadă la animalele martor pozitiv testate în paralel trebuie să fie în concordanță cu plaja de valori prestabilită a laboratorului pentru fiecare țesut și perioadă de prelevare de probe pentru specia respectivă (a se vedea punctul 16). În tabelul 1 sunt incluse exemple de substanțe martor pozitive și unele dintre țesuturile țintă ale acestora (la rozătoare). Se pot selecta alte substanțe decât cele indicate în tabelul 1, în cazul în care acest lucru poate fi justificat din punct de vedere științific.

Tabelul 1

Exemple de substanțe martor pozitive și unele dintre țesuturile țintă ale acestora

Substanțe și Nr. CAS RN
Etil metansulfonat (nr. CAS RN 62-50-0) pentru orice țesut
Etil nitrozouree (nr. CAS RN 759-73-9) pentru ficat și stomac, duoden sau jejun
Metil metansulfonat (nr. CAS RN 66-27-3) pentru ficat, stomac, duoden sau jejun, lavajul de celule pulmonare și bronhoalveolare (BAL), rinichi, vezică, plămâni, testicule și măduvă osoasă/sânge
N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidină (nr. CAS RN: 70-25-7) pentru stomac, duoden sau jejun
1,2-dimetilhidrazină 2HCl (nr. CAS RN 306-37-6) pentru ficat și intestin
N-methyl-N-nitrozouree (nr. CAS RN 684-93-5) pentru ficat, măduvă osoasă, sânge, rinichi, stomac, jejun și creier.

Martori negativi

Un grup de animale martor negativ, tratați numai cu vehicul și manipulați de altfel în același mod ca grupurile de tratament, se include la fiecare testare pentru fiecare perioadă de prelevare de probe și țesut. Procentul de ADN la coadă la animalele martor negativ trebuie să se încadreze în plaja de valori de fond prestabilite a laboratorului pentru fiecare țesut și perioadă de prelevare de probe pentru specia respectivă (a se vedea punctul 16). În absența unor date colectate anterior sau publicate cu privire la martori care să demonstreze faptul că vehiculul selectat, numărul de administrări sau calea de administrare nu induc efecte vătămătoare sau genotoxice, se efectuează studii inițiale înainte de efectuarea studiului complet pentru a stabili acceptabilitatea martorului vehicul.

PROCEDURĂ

Numărul și sexul animalelor

Cu toate că există puține date cu privire la animalele femele din care să se realizeze o comparație între sexe în ceea ce privește testul Comet, în general, alte răspunsuri de genotoxicitate *in vivo* sunt similare între masculi și femele și, prin urmare, majoritatea studiilor pot fi efectuate pe oricare dintre sexe. Datele care demonstrează diferențe relevante între masculi și femele (de exemplu, diferențele în materie de toxicitate sistemică, metabolism, biodisponibilitate etc., inclusiv, de exemplu, într-un studiu de stabilire a dozelor) încurajează utilizarea ambelor sexe. În acest caz, ar fi adecvat să se efectueze un studiu pe ambele sexe, de exemplu, ca parte dintr-un studiu de toxicitate la doze repetate. Utilizarea modelului factorial poate fi adecvată în cazul în care se utilizează ambele sexe. Apendicele 2 prezintă detalii cu privire la modalitatea de analiză a datelor utilizând acest model.

Se stabilește dimensiunea grupurilor la începutul studiului (și în timpul stabilirii competenței) cu scopul de a furniza cel puțin 5 animale analizabile de același sex sau din fiecare sex, în cazul în care se utilizează ambele sexe, pentru fiecare grup (mai puțin pentru grupul martor pozitiv testat în paralel – a se vedea punctul 29). În cazul în care expunerea umană la substanțe chimice este specifică unui anumit sex, cum ar fi, de exemplu, în cazul unor produse farmaceutice, testul se efectuează utilizând sexul corespunzător. Ca îndrumare pentru cerințe maxime tipice animalelor, un studiu efectuat în conformitate cu parametrii stabiliți la punctul 33 cu trei grupuri de dozare și martori pozitivi și negativi testați în paralel (fiecare grup compus din cinci animale de același sex) ar necesita între 25 și 35 de animale.

SCHEMĂ DE TRATAMENT

Se administrează tratament zilnic animalelor timp de 2 sau mai multe zile (și anume, două sau mai multe tratamente la intervale de 24 de ore) și se colectează probe o dată la 2-6 h (sau la T_{max}) după ultimul tratament (12). Se acceptă probe provenite din regimuri de dozare prelungite (de exemplu, dozare zilnică timp de 28 de zile). Combinarea cu succes a testul *in vivo* de micronucleu pe eritrocite cu testul Comet a fost demonstrată (10) (19). Cu toate acestea, trebuie acordată atenție deosebită logisticii implicate în prelevarea țesutului pentru analiza Comet, alături de cerințele de prelevare de țesuturi pentru alte tipuri de evaluări toxicologice. Recoltarea la 24 de ore după ultima doză, care este specifică pentru un studiu de toxicitate generală, nu este adecvată în majoritatea cazurilor (a se vedea punctul 40 cu privire la perioada de prelevare). Utilizarea altor scheme de tratament și prelevare se justifică (a se vedea appendicele 3). De exemplu, se poate utiliza tratament unic cu prelevare multiplă, cu toate acestea, se remarcă faptul că vor fi necesare mai multe animale pentru un studiu cu administrare unică din cauza necesității unor perioade de prelevare multiple, dar în unele cazuri acest lucru poate fi preferabil, de exemplu, atunci când substanța chimică de testat induce toxicitate excesivă în urma administrărilor repetate.

Indiferent de modalitatea în care testul este efectuat, acesta este acceptabil atât timp cât substanța chimică de testat furnizează un răspuns pozitiv sau, în cazul unui studiu negativ, atât timp cât s-au demonstrat probe directe sau indirecte ale expunerii sau toxicității țesutului (țesuturilor) țintă sau în cazul în care doza limită a fost atinsă (a se vedea punctul 36).

Substanțele chimice de testat se pot administra, de asemenea, în doză fracționată, și anume două tratamente în aceeași zi la distanță de nu mai mult de 2-3 ore, pentru a facilita administrarea unui volum mare. În aceste condiții, perioada de prelevare a probelor se programează în funcție de ultima administrare a dozei (a se vedea punctul 40).

Doze

În cazul în care se efectuează un studiu preliminar de stabilire a dozelor din cauza faptului că nu există date adecvate disponibile din alte studii relevante pentru a contribui la selectarea dozei, acesta se efectuează în același laborator, utilizând aceeași specie, sușă, sex și regimul de tratament care urmează să fie utilizate în studiul principal, în conformitate cu abordările actuale pentru efectuarea de studii de stabilire a dozelor. Studiul trebuie să aibă ca obiectiv identificarea dozei maxime tolerate (DMT), definită ca doza care induce efecte toxice ușoare în raport cu durata perioadei de studiu (de exemplu, semne clinice clare precum comportament sau reacții anormale sau scăderea ușoară a greutății corporale sau citotoxicitate în țesutul țintă), dar nu decesul sau semne de durere, suferință sau stres care necesită eutanasiere. În cazul unei substanțe chimice de testat netoxice cu o perioadă de administrare de 14 zile sau mai mult, doza maximă (limită) este de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi. În cazul perioadelor de administrare de mai puțin de 14 zile, doza maximă (limită) este de 2 000 mg/kg greutate corporală/zi. În cazul anumitor tipuri de substanțe chimice de testat (de exemplu, produsele farmaceutice umane) care fac obiectul unor reglementări specifice, aceste limite pot varia.

Substanțele chimice care prezintă saturația proprietăților toxicocinetice sau care provoacă procese de detoxifiere care pot conduce la o diminuare a expunerii după administrare pe termen lung pot face excepție de la criteriile de stabilire a dozelor și se evaluează de la caz la caz.

Atât pentru versiunea acută, cât și pentru cea subacută a testului Comet, în plus față de doza maximă (DMT, doza maximă posibilă, expunerea maximă sau doza limită), se selectează o serie derivată de cel puțin două doze suplimentare, spațiate în mod corespunzător (de preferință separate cu mai puțin de 10) pentru fiecare moment de prelevare pentru a demonstra răspunsuri legate de doză. Cu toate acestea, dozele utilizate acoperă, de asemenea, de preferință, o plajă de valori de la valoarea maximă până la valoarea care provoacă toxicitate mică sau nu provoacă toxicitate. Atunci când se observă toxicitate în țesutul țintă la toate dozele testate, se recomandă efectuarea unui studiu suplimentar la doze netoxice (a se vedea punctele 54-55). Studiile care au ca scop investigarea suplimentară completă a formei curbei doză-răspuns pot necesita un grup (grupuri) de dozaj suplimentar(e).

Administrarea dozelor

La elaborarea unui test se ia în considerare calea anticipată de expunere umană. Prin urmare, căile de expunere precum alimentația, apa potabilă, expunerea locală, subcutanată, intravenoasă, calea orală (prin gavaj), inhalarea, expunerea intratraheală sau implantarea pot fi alese ca fiind justificate. În orice caz, calea se alege pentru a asigura expunerea adecvată a țesutului (țesuturilor) țintă. Injecția intraperitoneală nu se recomandă, în general, deoarece nu este o cale tipică relevantă de expunere umană și se utilizează doar cu justificare specifică (de exemplu, unele substanțe martor pozitiv, în scop investigativ sau pentru anumite medicamente care se administrează pe calea intraperitoneală). Volumul maxim de lichid care se poate administra prin gavaj sau prin injecție într-o singură repriză depinde de dimensiunea animalului de laborator. Volumul nu trebuie să depășească 1 ml/100 g greutate corporală, exceptând cazul soluțiilor apoase, când se pot utiliza 2 ml/100g greutate corporală. Se justifică utilizarea unor volume mai mari decât această valoare (dacă acest lucru este permis de legislația privind bunăstarea animalelor). Ori de câte ori este posibil, se realizează diferite niveluri de dozare prin ajustarea concentrației formulei de dozare pentru a asigura un volum constant în raport cu greutatea corporală la toate nivelurile de dozare.

Prelevarea de probe

Prelevarea de probe este o variabilă esențială deoarece este determinată de perioada necesară pentru ca substanțele chimice de testat să atingă concentrația maximă în țesutul țintă și pentru provocarea întreruperilor lanțului ADN, dar înainte ca aceste întreruperi să fie îndepărtate, reparate sau să conducă la moarte celulară. Persistența unor leziuni care conduc la întreruperile lanțului ADN detectate de testul Comet poate fi foarte scurtă, cel puțin în cazul unor substanțe chimice testate *in vitro* (52) (53). În consecință, în cazul în care sunt suspectate astfel de leziuni tranzitorii ale ADN-ului, se iau măsuri pentru a reduce pierderile acestora prin asigurarea prelevării țesuturilor la momente suficient de timpurii, inclusiv mai devreme decât la momentele implicite indicate mai jos. Momentul (momentele) de prelevare optim(e) poate (pot) fi specific(e) substanței chimice sau căii de administrare, având ca rezultat, de exemplu, expunerea rapidă a țesutului cu administrare intravenoasă sau expunere prin inhalare. În consecință, după caz, se determină momentele de prelevare pe baza datelor cinetice (de exemplu, timpul (T_{max}) la care se atinge concentrația de vârf în plasmă sau țesut (C_{max}) sau la starea staționară la administrări multiple. În absența unor date cinetice, un compromis corespunzător pentru măsurarea genotoxicității este prelevarea de probe la 2-6 ore de la ultimul tratament pentru două sau mai multe tratamente sau atât la 2-6 h, cât și la 16-26 h după o singură administrare, cu toate că trebuie să se acorde atenție deosebită pentru a se efectua necropsia tuturor animalelor în același timp după ultima (singura) doză. Se pot utiliza, de asemenea, informații cu privire la apariția de efecte toxice în organele țintă (dacă sunt disponibile) pentru a selecta momente de prelevare adecvate.

Observații

Se recomandă efectuarea și înregistrarea observațiilor clinice generale referitoare la sănătatea animalelor cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași (aceleași) oră (ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrare (54). Cel puțin de două ori pe zi, se examinează toate animalele pentru a se determina morbiditatea sau mortalitatea. Pentru studii pe durată mai mare, se cântăresc toate animalele cel puțin o dată pe săptămână și la finalizarea perioadei de testare. Se măsoară consumul de hrană la fiecare schimbare de alimente și cel puțin o dată pe săptămână. În cazul în care substanța chimică de testat este administrată prin apa de băut, se măsoară consumul de apă la fiecare schimbare de apă și cel puțin o dată pe săptămână. Animalele care prezintă indicatori neletali de toxicitate excesivă se eutanasiază înaintea de finalizarea perioadei de testare și, în general, nu se utilizează pentru analiza Comet.

Colectarea de țesuturi

Întrucât este posibil să se studieze inducția întreruperilor lanțului ADN (comete) în aproape orice țesut, justificarea alegerii țesutului (țesuturilor) care urmează a fi colectat(e) trebuie să fie clar definită și să fie bazată la motivele efectuării studiului, împreună cu orice date ADME, de genotoxicitate, de carcinogenitate și alte date toxicologice existente referitoare la substanțele chimice de testat care fac obiectul studiului. Factorii importanți de luat în considerare includ calea de administrare [pe baza căii (căilor) de expunere umană], distribuția și absorbția preconizată în țesuturi, rolul metabolismului și eventualele mecanisme de acțiune ale substanțelor chimice de testat. Țesutul cel mai frecvent studiat a fost ficatul, pentru care există cele mai multe date. Prin urmare, în lipsa oricăror

informații generale și în cazul în care nu se identifică anumite țesuturi de interes, prelevarea de probe din ficat ar fi justificată, având în vedere faptul că aceasta este un loc principal de metabolism xenobiotic și deseori este extrem de expus atât la substanța (substanțe) mamă, cât și la metabolit (metaboliți). În unele cazuri, examinarea unui loc de contact direct (de exemplu, în cazul substanțelor chimice cu administrare orală, stomacul glandular sau duodenul/ jejunul sau în cazul substanțelor chimice inhalate, plămânii) poate fi cea mai relevantă. Se selectează țesuturi suplimentare sau alternative pe baza motivelor specifice pentru care se efectuează testul, dar examinarea de țesuturi multiple de la aceleași animale ar putea fi utilă, cu condiția ca laboratorul să fi demonstrat competența pentru țesuturile respective și competența în manipularea de țesuturi multiple în același timp.

Pregătirea specimenelor

Pentru procesele descrise la punctele următoare (44-49), este important ca toate soluțiile sau suspensiile stabile să fie utilizate înainte de data expirării sau să fie proaspăt preparate, dacă este necesar. De asemenea, în următoarele paragrafe, timpii necesari pentru (i) îndepărtarea fiecărui țesut după necropsie, (ii) procesarea fiecărui țesut în suspensii celulare/de nuclee și (iii) procesarea suspensiei și pregătirea lamelor sunt considerați variabile critice (a se vedea secțiunea Definiții, apendicele 1) și trebuie să fi fost determinate intervale de timp acceptabile pentru fiecare dintre aceste etape în timpul stabilirii metodei și al demonstrării competențelor.

Animalele vor fi eutanasiate în conformitate cu legislația aplicabilă privind bunăstarea animalelor și principiile celor 3R, la momentul (momentele) oportun(e) de la ultimul tratament cu substanța chimică de testat. Se înlătură și se disecă țesutul (țesuturile) selectat(e) și o parte se colectează pentru testul Comet, iar în același timp, se secționează o porțiune din aceeași parte de țesut și se introduce în soluție de formaldehidă sau într-un fixator adecvat pentru o posibilă analiză histopatologică (a se vedea punctul 55) în conformitate cu metodele standard (12). Se pune în tampon de mărunțire țesutul pentru testul Comet, se spală suficient în tampon de mărunțire rece pentru a îndepărta sângele rezidual și se depozitează în tampon de mărunțire răcit cu gheață până la procesare. Se poate efectua, de asemenea, perfuzarea *in situ*, de exemplu, pentru ficat, rinichi.

Există mai multe metode publicate pentru izolarea celulelor/nucleelor. Printre acestea se numără mărunțirea țesuturilor precum ficatul și rinichii, răzuirea suprafețelor mucoase în cazul tractului gastrointestinal, omogenizarea și digestia enzimatică. Studiul de validare JaCVAM a studiat numai celule izolate și, prin urmare, în ceea ce privește stabilirea metodei și posibilitatea de a face trimitere la datele generate de studiul JaCVAM pentru demonstrarea performanțelor, se preferă celule izolate. Cu toate acestea, s-a constatat faptul că nu există nicio diferență esențială în ceea ce privește rezultatele testului, indiferent dacă s-au utilizat celule izolate sau nuclee (8). De asemenea, diferite metode pentru izolarea celulelor/nucleelor (de exemplu, omogenizare, mărunțire, digestie enzimatică și filtrare prin plasă) au furnizat rezultate comparabile (55). În consecință, se pot utiliza fie celule izolate, fie nuclee izolate. Un laborator trebuie să evalueze cu atenție și să valideze metodele specifice țesuturilor de izolare a celulelor/nucleelor unice. Astfel cum s-a discutat la punctul 40, persistența unor leziuni care conduc la întreruperi ale lanțului ADN detectate de testul Comet poate fi foarte scurtă (52) (53). Prin urmare, indiferent de metoda utilizată pentru a pregăti suspensiile de celule/nuclee unice, este important că țesuturile să fie prelucrate cât mai curând posibil după ce animalele au fost eutanasiate și să fie depozitate în condiții care să reducă îndepărtarea leziunilor (de exemplu, prin menținerea țesutului la temperatură scăzută). Suspensiile de celule se păstrează la rece până la utilizare, astfel încât să se poată demonstra variația minimă între probe și răspunsurile martorilor pozitivi și negativi corespunzătoare.

PREGĂTIREA LAMELOR

Pregătirea lamelor se realizează cât mai curând posibil (în mod ideal, în termen de o oră) după prepararea celulei unice/nucleelor, dar intervalul de timp între decesul animalului și pregătirea lamelor se controlează în mod strict și se validează conform condițiilor laboratorului. Volumul suspensiei celulare adăugate la agaroză cu punct de topire scăzut (de regulă 0,5-1,0 %) pentru a pregăti lamele nu trebuie să reducă procentul de agaroză cu punct de topire scăzut la mai puțin de 0,45 %. Se va determina densitatea celulară optimă prin sistemul de analiză a imaginilor utilizat pentru examinarea cometelor.

Liză

Condițiile de liză, de asemenea, sunt variabile esențiale și pot interacționa cu întreruperile lanțului rezultate din anumite tipuri de modificări de ADN (anumite alchinări ale ADN-ului și aducții de bază). Prin urmare, se recomandă menținerea cât mai constantă posibil a condițiilor de liză pentru toate lamele în cadrul unui experiment. Odată preparate, se imersează lamele în soluție de liză răcită timp de cel puțin o oră (sau peste noapte) la aproximativ 2-8 °C în condiții de iluminare redusă, de exemplu lumină galbenă (sau ferite de lumină), evitând expunerea la lumină albă care ar putea conține componente UV. După această perioadă de incubare, se clătesc lamele pentru eliminarea reziduurilor de detergent și a sărurilor înainte de etapa de corectare alcalină. Acest lucru se poate realiza utilizând apă purificată, tampon de neutralizare sau tampon fosfat. Se poate utiliza, de asemenea, tampon de electroforeză. Această acțiune ar menține condiții alcaline în camera de electroforeză.

Corectare și electroforeză

Lamele se introduc în mod aleatoriu pe platforma unei unități de electroforeză de tip submarin care conține suficientă soluție de electroforeză astfel încât suprafețele lamelor să fie total acoperite (adâncimea acoperirii trebuie să fie consecventă, de asemenea, de la o determinare la alta). În cazul altui tip de unități de electroforeză a testului Comet, și anume, prin răcire activă, circulație și sursă de alimentare de înaltă tensiune, o soluție cu o acoperire mai mare va rezulta într-un curent electric de o intensitate mai mare, în timp ce tensiunea electrică este păstrată constantă. La plasarea lamelor în cuva de electroforeză se utilizează un model echilibrat pentru a atenua orice tendință sau efect de margine în cuvă și pentru a reduce la minimum variabilitatea între loturi, de exemplu la fiecare determinare de electroforeză se utilizează același număr de lame de la fiecare animal în studiu și se includ probe de la grupuri diferite de dozare, martori negativi și martori pozitivi. Se lasă lamele pentru cel puțin 20 de minute pentru ca ADN-ul să se corecteze și ulterior se supun la electroforeză în condiții controlate care vor maximiza sensibilitatea și gamă dinamică a testului (și anume, vor conduce la niveluri acceptabile de % de ADN la coadă pentru martorii negativi și pozitivi care maximizează sensibilitatea). Nivelul migrației de ADN este asociat în mod liniar cu durata de electroforeză și, de asemenea, cu potențialul (V/cm). Pe baza studiului JaCVAM, acesta ar putea fi de 0,7 V/cm timp de cel puțin 20 de minute. Durata electroforezei este considerată o variabilă esențială și timpul de electroforeză se stabilește astfel încât să optimizeze gama dinamică. Timpii mai lungi de electroforeză (de exemplu, 30 sau 40 minute pentru a maximiza sensibilitatea), de regulă, conduc la răspunsuri pozitive mai puternice cu mutageni cunoscuți. Cu toate acestea, timpii mai lungi de electroforeză, de asemenea, conduc la migrație excesivă în probele martor. În fiecare experiment, tensiunea se menține constantă și variabilitatea în ceilalți parametri trebuie să se încadreze într-o plajă de valori restrânsă și specifică, de exemplu, în studiul JaCVAM, 0,7 V/cm a emis un curent de pornire de 300 mA. Adâncimea tamponului se ajustează pentru a îndeplini condițiile necesare și se menține pe tot parcursul experimentului. Se înregistrează curentul electric la începutul și la sfârșitul perioadei de electroforeză. Se determină, prin urmare, condițiile în timpul demonstrației inițiale a performanțelor în laborator în cauză, cu fiecare țesut studiat. Se menține la o temperatură scăzută soluția de electroforeză pe tot parcursul procesului de corecție și electroforeză, de regulă la 2-10 °C (10). Se înregistrează temperatura soluției de electroforeză la începutul procesului de corecție, la începutul electroforezei și la finalizarea electroforezei.

După finalizarea electroforezei, se imersează/spală lamele în tampon de neutralizare timp de cel puțin 5 minute. Gelurile pot fi colorate și punctate „proaspăt” (de exemplu, în decurs de 1-2 zile) sau pot fi deshidratate în punctarea ulterioară (de exemplu, în termen de 1-2 săptămâni după colorare) (56). Cu toate acestea, se validează condițiile în timpul demonstrației de competență și se obțin și se păstrează separat date colectate anterior pentru fiecare dintre aceste condiții. În cel din urmă caz, se deshidratează lamele prin imersie în etanol absolut timp de cel puțin 5 minute, se lasă la aer uscat și ulterior se depozitează fie la temperatura camerei, fie într-un container în frigider până la punctare.

Metode de măsurare

Se punctează cantitativ cometele utilizând un sistem de analiză a imaginii semiautomat sau automat. Se vor colora lamele cu colorație cu fluoresceină corespunzătoare, de exemplu, SYBR Gold, Green I, iodură de propidium sau bromură de etidiu și se măsoară la o mărire adecvată (de exemplu, 200x) cu un microscop prevăzut cu epifluorescență și detectoare corespunzătoare sau o cameră digitală (de exemplu, CCD).

Celulele pot fi clasificate în trei categorii, astfel cum sunt descrise în atlasul imaginilor Comet (57), și anume, „punctabile”, „nepunctabile” și „arici” (a se vedea punctul 56 pentru discuții suplimentare). Pentru punctarea % de ADN la coadă se punctează numai celulele punctabile (cap și coadă definite în mod clar, fără interferență cu celulele vecine) pentru a se evita rezultatele distorsionate. Nu este necesar să se raporteze frecvența celulelor nepunctabile. Se determină frecvența celulelor arici pe baza punctării vizuale (având în vedere faptul că absența unui cap definit în mod clar va însemna că acestea nu sunt ușor de detectat prin analiza imaginii) pentru cel puțin 150 de celule pentru fiecare probă (a se vedea punctul 56) și se documentează în mod separat.

Se codifică în mod independent și se punctează „pe nevăzute” toate lamele de analizat, inclusiv cele cu martori pozitivi și negativi, astfel încât examinatorul să nu cunoască condiția de tratament. Se analizează cel puțin 150 de celule (cu excepția celulelor arici – a se vedea punctul 56) pe fiecare probă (pe țesut pentru fiecare animal). Punctarea a 150 de celule pentru fiecare animal la cel puțin 5 animale pe doză (mai puțin pentru martorul pozitiv testat în paralel – a se vedea punctul 29) furnizează o putere statistică adecvată conform analizei Smith *et al.*, 2008 (5). În cazul în care se utilizează lame, aceasta ar putea fi de la 2 sau 3 lame punctate pentru fiecare probă atunci când se utilizează cinci animale pentru fiecare grup. Se observă mai multe zone ale lamelor la o densitate care să asigure că nu există suprapuneri de cozi. Se evită punctarea la marginea lamelor.

Întreruperile lanțului ADN în testul Comet pot fi măsurate prin criterii independente precum % de ADN la coadă, lungimea cozii și momentul cozii. Toate cele trei măsurători pot fi efectuate în cazul în care se utilizează un sistem software de analiză a imaginii. Cu toate acestea, % de ADN la coadă (cunoscut, de asemenea, ca % de intensitate la coadă) este recomandat pentru evaluarea și interpretarea rezultatelor (12) (40) (41) (42) și este determinat de intensitatea fragmentele de ADN în coadă, exprimată ca procent din intensitatea celulară totală (13).

Lezarea și citotoxicitatea tisulară

Rezultatele pozitive în testul Comet nu se datorează numai genotoxicității; toxicitatea țesutului țintă, de asemenea, poate conduce la creșterea migrației ADN-ului (12) (41). Dimpotrivă, un nivel scăzut sau moderat de citotoxicitate este adesea observat la genotoxinele cunoscute (12), demonstrând faptul că nu este posibil să se facă o distincție între migrația ADN-ului indusă de genotoxicitate și cea indusă de citotoxicitate în testul Comet individual. Cu toate acestea, în cazul în care se observă creșteri ale migrației ADN-ului, se recomandă efectuarea unei examinări a unui sau a mai multor indicatori ai citotoxicității, având în vedere faptul că acest lucru poate contribui la interpretarea descoperirilor. Se interpretează cu prudență creșterile migrației ADN-ului în prezența unor dovezi clare privind citotoxicitatea.

Au fost propuse mai multe măsuri ale citotoxicității și, dintre acestea, modificările histopatologice relevante sunt considerate o măsură relevantă de toxicitate tisulară. Observații precum inflamarea, infiltrarea celulară, modificările apoptotice sau necrotice au fost asociate cu creșterea migrației ADN-ului, cu toate că, astfel cum s-a demonstrat în cadrul studiului de validare JaCVAM (12), nu este disponibilă nicio listă definitivă a modificărilor histopatologice care sunt asociate întotdeauna cu migrația crescută a ADN-ului. Modificări ale măsurilor clinice chimice (de exemplu, AST, ALT) pot furniza, de asemenea, informații utile cu privire la lezarea tisulară și indicatorii suplimentari precum activarea caspazelor, colorația TUNEL, colorația Annexin V etc. pot fi luați în considerare, de asemenea. Cu toate acestea, există un număr limitat de date publicate cu privire la utilizarea celor din urmă pentru studii *in vivo* și unele pot fi mai puțin fiabile decât altele.

Aricii (sau norii, celulele fantomă) sunt celule care prezintă o imagine microscopică care constă într-un cap mic sau inexistent și cozi mari, difuze care sunt considerate a fi celule puternic lezate, cu toate că etiologia aricilor este incertă (a se vedea appendicele 3). Din cauza aspectului acestora, măsurătorile prin analiza imaginii a % de ADN la coadă nu sunt fiabile și, prin urmare, aricii se evaluează în mod separat. Se notează și se raportează apariția celulelor arici și se investighează și se interpretează cu prudență orice creștere semnificativă considerată a fi cauzată de substanța chimică de testat. Cunoștințele cu privire la potențialul mod de acțiune al substanțelor chimice de testat pot contribui la astfel de considerații.

DATE ȘI RAPORTARE

Interpretarea rezultatelor

Unitatea experimentală este animalul, prin urmare, se prezintă sub formă de tabel atât datele individuale referitoare la fiecare exemplar, cât și rezultatele sintetice. Din cauza naturii ierarhice a datelor, se recomandă determinarea valorii medii de % ADN la coadă pentru fiecare lamă și calcularea mediei valorilor medii pentru fiecare animal (12). Se determină ulterior media pentru mediile fiecărui animal pentru a obține o medie a grupului. Toate aceste valori se includ în raport. Se pot utiliza abordări alternative (a se vedea punctul 53) în cazul în care acest lucru este justificat din punct de vedere științific și statistic. Analiza statistică se poate realiza utilizând o varietate de abordări (58) (59) (60) (61). Atunci când se selectează metodele statistice care urmează să fie utilizate, se ia în considerare necesitatea transformării (de exemplu, un log sau rădăcină pătrată) a datelor și/sau adăugarea unui număr redus (de exemplu 0,001) la toate valorile (inclusiv non-zero) pentru a atenua efectele valorilor celulare zero, astfel cum s-a discutat în referințele de mai sus. În apendicele 2 se furnizează detalii privind analiza interacțiunilor tratament/sex atunci când se utilizează ambele sexe, precum și analiza ulterioară a datelor în cazul în care fie se constată diferențe între acestea, fie nu se constată nicio diferență. Se raportează, de asemenea, date cu privire la toxicitate și semnele clinice.

Criterii de acceptabilitate

Acceptarea unui test se bazează pe următoarele criterii:

- a. Martorul negativ testat în paralel este considerat acceptabil pentru adăugarea la baza de date colectate anterior cu privire la martorii negativi a laboratorului, astfel cum este descris la punctul 16.
- b. Martorii pozitivi testați în paralel (a se vedea punctul 29) trebuie să determine răspunsuri care sunt compatibile cu cele provenite din baza de date colectate anterior cu privire la martorii pozitivi și să producă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic, comparativ cu martorul negativ.
- c. Analizarea unui număr adecvat de celule și doze (punctul 52 și punctele 36-38).
- d. Criteriile de selectare a dozei maxime sunt consecvente cu cele descrise la punctul 36.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar pozitivă în cazul în care:

- a. cel puțin una dintre dozele de testare prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel,
- b. atunci când este evaluată prin intermediul unui test de stabilire a tendinței corespunzător, creșterea depinde de doză,
- c. oricare dintre rezultate se află în afara distribuției de date colectate anterior cu privire la martorii negativi pentru o anumită specie, vehicul, cale, țesut și număr de administrări.

La îndeplinirea tuturor acestor criterii, substanța chimică de testat este considerată, prin urmare, ca fiind capabilă să inducă întreruperea lanțului ADN în țesuturile studiate în prezentul sistem de testare. În cazul în care se îndeplinesc numai unul sau două dintre aceste criterii, a se vedea punctul 62.

Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar negativă în cazul în care:

- a. niciuna dintre concentrațiile de testare nu prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel,
- b. nu există nicio creștere legată de concentrație la evaluarea prin intermediul unui test de stabilire a tendinței.
- c. toate rezultatele se situează în interiorul distribuției de date colectate anterior cu privire la martorii negativi pentru o anumită specie, vehicul, cale, țesut și număr de administrări.
- d. au fost demonstrate probe directe sau indirecte ale expunerii sau toxicității țesutului (țesuturilor) țintă.

Substanța chimică testată este considerată, prin urmare, ca fiind incapabilă să inducă întreruperea lanțului ADN în țesuturile studiate în prezentul sistem de testare.

Nu există nicio cerință referitoare la verificarea unui răspuns clar pozitiv sau negativ.

În cazul în care răspunsul nu este nici în mod clar negativ, nici în mod clar pozitiv (și anume, nu se îndeplinesc toate criteriile listate la punctul 59 sau 60) și pentru a contribui la stabilirea relevanței biologice a unui rezultat, se evaluează datele de către experți și/sau prin anchete suplimentare efectuate, dacă este justificat din punct de vedere științific. Ar putea fi utilă punctarea de celule suplimentare (după caz) sau repetarea experimentului, cu posibila utilizare a unor condiții experimentale optimizate (de exemplu, spațierea dozelor, alte căi de administrare, alte momente de prelevare sau alte țesuturi).

În cazuri rare, chiar și după efectuarea de investigații suplimentare, setul de date va exclude posibilitatea stabilirii unei concluzii pentru rezultate pozitive sau negative și, prin urmare, acesta va fi concluzionat ca fiind echivoc.

Pentru a evalua relevanța biologică a unui rezultat pozitiv sau echivoc sunt necesare informații cu privire la citotoxicitatea în țesutul țintă (a se vedea punctele 54-55). În cazul în care se observă rezultate pozitive sau echivoce numai în prezența unor dovezi clare de citotoxicitate, studiul va fi concluzionat ca echivoc pentru genotoxicitate, cu excepția cazului în care există suficiente informații care să sprijine o concluzie definitivă. În cazul unui rezultat negativ al studiului cu semne de toxicitate la toate dozele testate, se poate recomanda efectuarea unui studiu suplimentar la doze netoxice.

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanță chimică de testat:

- sursa, numărul lotului, dacă este disponibil;
- stabilitatea substanței chimice de testat, data limită de utilizare sau data pentru reanalizare, dacă se cunoaște.

Substanță monocomponentă:

- aspectul fizic, solubilitatea în apă și proprietăți fizico-chimice suplimentare relevante;
- identificare chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS, Codul SMILES sau InChI, formula structurală, puritatea, identitatea impurităților chimice, după cum este adecvat și fezabil din punct de vedere practic, etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

- caracterizate, în măsura în care este posibil, prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Solvent/vehicul

- justificarea alegerii solventului/vehiculului;
- solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent/vehicul, dacă se cunosc;
- pregătirea formulărilor de doză;
- determinări analitice cu privire la formulări (de exemplu, stabilitate, omogenitate, concentrații).

Animalele de experiență:

- specii/sușa utilizată și justificarea științifică și etică pentru alegere;
- numărul, vârsta și sexul animalelor;

- sursă, condiții de adăpostire, hrană, îmbogățirea etc.;
- greutatea fiecărui animal la începutul și la sfârșitul testului, inclusiv intervalul de greutate corporală, valoarea medie și deviația standard pentru fiecare grup.

Condiții de testare:

- date cu privire la martori pozitivi și negativi (solvent/vehicul);
- rezultatele studiului de stabilire a dozelor (dacă s-a efectuat);
- justificarea selecției nivelului de doză administrată;
- detalii privind prepararea substanței chimice de testat;
- detalii privind modalitatea de administrare a substanței chimice de testat;
- justificarea căii de administrare;
- locul de injecție (pentru studiile subcutanate sau intravenoase);
- metode de preparare a probelor, dacă sunt disponibile, analize histopatologice, în special pentru o substanță chimică ce furnizează un răspuns Comet pozitiv;
- justificarea selecției țesutului;
- metode prin care se verifică dacă substanța chimică de testat a ajuns în țesutul țintă sau în circulația generală, în cazul în care se obțin rezultate negative;
- doza efectivă (mg/kg greutate corporală/zi) calculată din concentrația substanței chimice de testat (ppm) în hrană/ apă potabilă și consum, dacă este cazul;
- detalii privind calitatea hranei și a apei;
- descrierea amănunțită a schemelor de tratament și de prelevare a probelor și justificarea alegerilor (de exemplu, date toxicocinetice, dacă sunt disponibile);
- metoda de ameliorare a durerii, analgezice;
- metoda de eutanasiere;
- proceduri pentru izolarea și păstrarea țesuturilor;
- metode pentru pregătirea suspensiei de celule unice/nuclee;
- sursa și numărul lotului tuturor reactivilor (dacă este posibil);
- metode de evaluare a citotoxicității;
- condiții de electroforeză;
- tehnicile de colorare utilizate;
- metodele de punctare și de măsurare a cometelor.

Rezultate:

- Observații clinice generale, dacă există, înaintea și pe durata perioadei de testare pentru fiecare animal;
- dovezi de citotoxicitate, dacă au fost efectuate;
- pentru studiile mai lungi de o săptămână: Greutățile corporale individuale pe parcursul studiului, inclusiv intervalul de greutate corporală, valoarea medie și deviația standard pentru fiecare grup; consumul de hrană;

- relația doză-răspuns, în cazurile în care este evidentă;
- pentru fiecare țesut/animal, % de ADN la coadă (sau alte măsuri, în cazul în care se aleg) și valorile medii pentru fiecare lamă, valori medii pentru fiecare animal și valorile medii pentru fiecare grup;
- date privind martorii negativi testați în paralel și date colectate anterior cu privire la martorii negativi, cu intervale, valori medii/mediane și deviații standard pentru fiecare țesut evaluat;
- date privind martorii pozitivi testați în paralel și date colectate anterior cu privire la martorii negativi;
- pentru țesuturi altele decât ficatul, o curbă doză-răspuns utilizând martorul pozitiv. Acesta poate proveni din date colectate în cursul demonstrației de competență (a se vedea punctele 16-17) și trebuie să fie însoțită de o justificare, cu trimiteri la literatura de specialitate la zi pentru caracterul adecvat al amplitudinii și dispersiei răspunsurilor la martori în țesutul respectiv;
- analize statistice și metode aplicate; și criteriile în funcție de care un răspuns este considerat ca fiind pozitiv, negativ sau echivoc;
- frecvența celulelor arici în fiecare grup și pentru fiecare animal.

Discutarea rezultatelor

Concluzie

Referințe

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, p. 114-32.
- (2) Brendler-Schwaab, S. *et al.* (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, p. 245-54.
- (3) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, p. 31-5.
- (4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, p. 143-63.
- (5) Smith, C.C. *et al.* (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, p. 233-40.
- (6) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, p. 45-51.
- (7) McKelvey-Martin, V.J. *et al.* (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, p. 47-63.
- (8) Tice, R.R. *et al.* (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, p. 206-21.
- (9) Singh, N.P. *et al.* (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, p. 184-91.
- (10) Rothfuss, A. *et al.* (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, p. 40-69.
- (11) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

- (12) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.
- (13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the „Comet” assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, p. 86-94.
- (14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, p. 207-14.
- (15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, p. 249-61.
- (16) Rothfuss, A. *et al.* (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, p. 108-20.
- (17) Kushwaha, S. *et al.* (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, p. 145–54.
- (18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, p. 187-99.
- (19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, p. 7-19.
- (20) Recio, L. *et al.* (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, p. 149-62.
- (21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, p. 621-3.
- (22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations**, *Mutagenesis*, Vol. 19/1, p. 51-9.
- (23) Nessler, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, p. 28-41.
- (24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, p. 175-8.
- (25) Toyozumi, T. *et al.* (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, p. 175-80.
- (26) Struwe, M. *et al.* (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, p. 240-9.
- (27) Wada, K. *et al.* (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, p. 26-30.
- (28) Wang, A. *et al.* (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, p. 51-9.

- (29) Burlinson, B. *et al.* (2007), *In Vivo Comet Assay Workgroup*, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, p. 31-5.
- (30) Jackson, P. *et al.* (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, p. 486-500.
- (31) Sasaki, Y.F. *et al.* (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, p. 629-799.
- (32) Sekihashi, K. *et al.* (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, p. 53-74.
- (33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity**, *Mutation Research*, Vol. 681/1, p. 3-12.
- (34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, p. 275-282.
- (35) Cordelli, E. *et al.* (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, p. 443-451.
- (36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, p. 167-72.
- (37) Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, p. 196-201.
- (38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, p. 165-81.
- (39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay**, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, p. 267-282.
- (40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605 (1-2), p. 7-16.
- (41) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, p. 31-5.
- (42) Kumaravel, T.S. *et al.* (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, p. 53-64.
- (43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, p. 689-95.
- (44) Møller, P. *et al.* (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, p. 109-11.
- (45) Forchhammer, L. *et al.* (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, p. 113-23.
- (46) Azqueta, A. *et al.* (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, p. 4145.

- (47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, p. 87-90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, John Wiley and Sons, New York 2nd ed.
- (49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123)
- (50) Capitolul B.8 din prezenta anexă: *Toxicitatea subacută la inhalare: Studiu de 28 de zile.*
- (51) Capitolul B.29 din prezenta anexă: *Toxicitatea subacută la inhalare: Studiu de 90 de zile.*
- (52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, p. 141-45.
- (53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, p. 3541.
- (54) OECD (2002), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.
- (55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, p. 50-4.
- (56) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, p.45-51.
- (57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co.,Ltd., Tokyo, Japan.
- (58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, p. 109-19.
- (59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, p. 167-75.
- (60) Bright, J. *et al.* (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, p. 485-93.
- (61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, p. 171-82.
-

Apendicele 1

DEFINIȚII

Electroforeză în gel pe celule unice alcaline: Tehnică sensibilă pentru detectarea lezării primare a ADN-ului la nivelul celulelor individuale/nucleului.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Cometă: Forma pe care o adoptă nucleozii după ce au fost supuși unui câmp electroforetic, datorită asemănării acestora cu cometele: capul este nucleul, iar coada este formată de ADN-ul care migrează din nucleu în câmpul electric.

O variabilă/parametru esențial: Aceasta este o variabilă de protocol pentru care o schimbare mică poate avea un impact mare la finalizarea testului. Variabilele esențiale pot fi specifice în funcție de țesut. Variabilele critice nu se modifică, în special în cadrul unui test, fără a lua în considerare modul în care modificarea va afecta răspunsul unui test, de exemplu astfel cum este indicat de amploarea și variabilitatea în martorii pozitivi și negativi. Raportul de testare enumeră modificările variabilelor esențiale efectuate în timpul testului sau în comparație cu protocolul standard de laborator și furnizează o justificare pentru fiecare modificare.

Intensitatea la coadă sau % de ADN la coadă: Aceasta corespunde intensității cozii cometei în raport cu intensitatea totală (cap și coadă). Aceasta reflectă cantitatea de întreruperi ale ADN-ului, exprimată ca procent.

Substanță chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare.

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

Apendicele 2

MODELUL FACTORIAL PENTRU IDENTIFICAREA DIFERENȚELOR ÎNTRE SEXE ÎN TESTUL COMET IN VIVO**Modelul factorial și analiza acestuia**

În acest model, se testează un minim de 5 masculi și 5 femele la fiecare nivel de concentrație, rezultând un model de testare care utilizează un minim de 40 de animale (20 de masculi și 20 de femele, plus martori pozitivi relevanți).

Modelul, care este unul dintre cele mai simple modele factoriale, este echivalent cu o analiză bidirecțională a varianței, având ca efecte principale sexul și nivelul de concentrație. Datele pot fi analizate utilizând numeroase pachete software standard pentru statistici cum ar fi SPSS, SAS, STATA, Genstat, precum și utilizând R.

Analiza împarte variabilitatea în setul de date în cea dintre sexe, cea dintre concentrații și cea referitoare la interacțiunea dintre sexe și concentrații. Se testează fiecare dintre termeni în raport cu o estimare a variabilității între animalele replică în cadrul grupurilor de animale de același sex la aceeași concentrație. Detalii complete privind metodologia de bază sunt disponibile în numeroase manuale statistice standard (a se vedea referințele) și în secțiunea „Ajutor” pusă la dispoziție odată cu pachetele statistice.

Analiza se desfășoară prin inspectarea condiției de interacțiune a sex x concentrație în tabelul ANOVA ⁽¹⁾. În absența unei durate semnificative de interacțiune, valorile combinate între sexe sau valorile combinate între nivelurile de concentrație furnizează teste statistice valabile între niveluri pe baza duratei de variabilitate reunite în cadrul grupului.

Analiza continuă prin divizarea estimării variabilității dintre concentrații în contraste care furnizează un test de contraste lineare și pătratice ale răspunsurilor între nivelurile de concentrație. În cazul în care există o interacțiune semnificativă sex x concentrație, această condiție poate fi divizată, de asemenea, în contraste de interacțiune liniară a sexului x și contraste de interacțiune pătratică a sexului x. Aceste condiții furnizează teste ale faptului dacă răspunsurile de concentrație sunt paralele pentru cele două sexe sau există un răspuns diferențiat între cele două sexe.

Estimarea variabilității reunite în cadrul grupului poate fi utilizată pentru a furniza teste pe perechi cu privire la diferența dintre valorile medii. Aceste comparații ar putea fi efectuate între valorile medii pentru cele două sexe și între valorile medii pentru nivelurile diferite de concentrație, precum cele pentru comparații cu nivelurile de martori negativi. În cazurile în care există o interacțiune semnificativă, se pot efectua comparații între valorile medii de concentrații diferite pentru un sex sau între valorile medii ale sexelor la aceeași concentrație.

Referințe

Există numeroase manuale statistice care tratează teoria, conceperea, metodologia, analiza și interpretarea modelelor factoriale, variind de la analizele cele mai simple cu doi factori la forme mai complexe utilizate în metodologia de concepere a experimentelor. Lista de mai jos este o listă neexhaustivă. Unele cărți oferă exemple concrete de modele de testare comparabile, în unele cazuri cu codul pentru efectuarea analizelor utilizând diferite pachete software.

- (1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.
- (2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.
- (3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

⁽¹⁾ Statisticienii care adoptă o abordare bazată pe modelare, precum utilizarea modelelor liniare generalizate (GLM) pot aborda analiza într-o manieră diferită, dar comparabilă, dar acest lucru nu va deriva în mod necesar din tabelul ANOVA tradițional, care datează de la abordările algoritmice pentru calculul statisticilor dezvoltate în epoca de dinaintea computerului.

-
- (4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.
 - (5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.
 - (6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.
 - (7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.
-

Apendicele 3

LIMITĂRI ACTUALE ALE TESTULUI

Datorită stadiului actual al cunoștințelor, mai multe limitări sunt asociate cu testul Comet *in vivo*. Se preconizează că aceste limitări vor fi reduse sau delimitate mai precis, întrucât s-a dobândit mai multă experiență în aplicarea testului pentru a răspunde problemelor de siguranță într-un context normativ.

1. Unele tipuri de leziuni ale ADN-ului pot fi de scurtă durată, și anume pot fi reparate prea repede pentru a fi observate în 24 ore sau mai mult de la ultima administrare. Nu se poate identifica o lista a tipurilor de leziuni de scurtă durată, nici a substanțelor chimice care sunt susceptibile să producă acest tip de lezare. Momentul (momentele) optim(e) de prelevare poate (pot) fi specific(e), de asemenea, substanței chimice sau căii de administrare și momentele de prelevare se determină pe baza datelor cinetice (de exemplu, timpul T_{max} la care se atinge concentrația de vârf în plasmă sau țesut), atunci când aceste date sunt disponibile. Majoritatea studiilor de validare care sprijină această metodă de testare au specificat necropsia în 2 sau 3 ore de la administrarea dozei finale. Majoritatea studiilor din literatura de specialitate descriu administrarea dozei finale între 2 și 6 ore înainte de sacrificare. Prin urmare, aceste experiențe au fost utilizate ca bază pentru recomandarea în cadrul metodei de testare conform căreia, în lipsa unor date care să indice contrariul, se administrează doza finală la un anumit timp specific între 2 și 6 ore înainte de necropsie.
2. Nu există date de studiu identificabile care să examineze sensibilitatea testului pentru detectarea leziunilor ADN-ului de scurtă durată în urma administrării în hrana sau în apa de băut în comparație cu administrarea prin gavaj. Lezarea ADN-ului a fost detectată în urma administrării în hrana animalelor și în apa de băut, dar există relativ puține astfel de rapoarte în comparație cu experiența mult mai vastă cu gavajul și administrarea i.p. Prin urmare, sensibilitatea testului poate fi redusă pentru substanțele chimice care induc leziuni cu durată scurtă de viață administrate prin hrană sau apa de băut.
3. Nu au fost efectuate studii interlaboratoare în țesuturi, altele decât ficat și stomac, prin urmare, nu au fost stabilite recomandări pentru modul în care se poate obține un răspuns sensibil și reproductibil în țesuturi altele decât ficatul, cum ar fi plaje de valori preconizate ale martorilor pozitivi și negativi. De asemenea, pentru ficat, nu s-a ajuns la un acord privind stabilirea unei limite inferioare pentru valoarea martorului negativ.
4. Cu toate că există mai multe publicații care demonstrează efectul de confuzie al citotoxicității *in vitro*, au fost publicate foarte puține date *in vivo* și, prin urmare, nu a fost recomandată nicio măsură unică de citotoxicitate. Modificările histopatologice precum inflamarea, infiltrația celulară, modificările apoptotice sau necrotice au fost asociate cu creșteri ale migrației ADN-ului, cu toate că, astfel cum s-a demonstrat prin studiul de validare JaCVAM (OCDE, 2014), aceste modificări nu au întotdeauna ca efect constatări Comet pozitive și, prin urmare, nu este disponibilă nicio listă definitivă a modificărilor histopatologice care sunt asociate întotdeauna cu creșterea migrației ADN-ului. Celulele arici (sau nori, celule fantome) au fost sugerate anterior ca un indicator de citotoxicitate, însă etiologia celulelor arici este incertă. Există date care sugerează faptul că acestea pot fi cauzate de citotoxicitatea dată de substanța chimică, lezarea indusă mecanic/enzimatic în cursul preparării probei (Guerard *et al.*, 2014) și/sau un efect la niveluri extreme de genotoxicitate a substanței chimice de testat. Alte date par să demonstreze că acestea se datorează lezării extensive, dar probabil reparabile a ADN-ului (Lorenzo *et al.*, 2013).
5. Țesuturile sau nuclee celulare au fost înghețate cu succes pentru a fi analizate mai târziu. În mod normal, acest lucru conduce la un efect măsurabil asupra răspunsului la vehiculul și martorul pozitiv (Recio *et al.*, 2010; Recio *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2013). În cazul în care se utilizează înghețarea, laboratorul trebuie să demonstreze competență în metodologiile de înghețare și să confirme plaje de valori scăzute acceptabile de % de ADN la coadă în țesuturile țintă ale animalelor tratate cu vehicul și faptul că răspunsuri pozitive pot fi încă detectate. În referințele bibliografice, înghețarea țesuturilor a fost descrisă utilizând diferite metode. Cu toate acestea, în prezent, nu există niciun acord cu privire la cele mai bune modalități de a îngheța și a dezgheța țesuturi, precum și la modul în care se evaluează dacă un eventual răspuns modificat poate afecta sensibilitatea testului.
6. Lucrările recente demonstrează că lista variabilelor esențiale se preconizează să devină mai scurtă în continuare și parametrii pentru variabilele esențiale, mai precis definiți (Guerard *et al.*, 2014).

Referințe

- (1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, p. 11421.
- (2) Jackson, P. *et al.* (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, p. 699-707.
- (3) Lorenzo, Y. *et al.* (2013), The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, p. 427-32.
- (4) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.
- (5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:14962.
- (6) Recio, L. *et al.* (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, p. 101-13."

(16) În partea C, capitolul C.13 se înlocuiește cu următorul text:

„C.13 Bioacumularea la pești: Expunerea prin apă și prin alimentație

INTRODUCERE

Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 305 (2012). Obiectivul major al actualei revizuirii a metodei de testare privește două aspecte. În primul rând, aceasta este destinată să includă un test de bioacumulare alimentară ⁽¹⁾ adecvat pentru a determina potențialul de bioacumulare al substanțelor cu solubilitate foarte scăzută în apă. În al doilea rând, aceasta urmărește să creeze o metodă de testare care, atunci când este cazul, utilizează mai puțini pești din motive de bunăstare a animalelor și care este mai eficientă din punct de vedere al costurilor.

În anii de după adoptarea metodei de testare consolidate C.13 (1) au fost testate numeroase substanțe și s-a acumulat o experiență considerabilă atât de către laboratoare, cât și de autoritățile de reglementare. Acest lucru a condus la convingerea că poate fi redusă complexitatea testului dacă se îndeplinesc criterii specifice (a se vedea punctul 88) și că o abordare secvențială este posibilă. Experiența a arătat, de asemenea, că factorii biologici precum rata de creștere și conținutul de lipide din pește pot avea un impact semnificativ asupra rezultatelor și ar putea fi necesară luarea lor în considerare. În plus, s-a recunoscut faptul că testarea substanțelor cu solubilitate foarte scăzută în apă poate să nu fie fezabilă din punct de vedere tehnic. În plus, în cazul substanțelor cu solubilitate foarte scăzută în apă în mediul acvatic, expunerea prin apă poate avea o importanță limitată în comparație cu administrarea prin alimentație. Acest lucru a condus la elaborarea unei metode de testare în care peștii sunt expuși prin intermediul alimentației acestora (a se vedea punctele 7-14 și începând cu 97). În anul 2010 a fost efectuată validarea (test interlaboratoare) testului de expunere prin alimentație (51).

Principalele modificări includ:

- Testarea unei singure concentrații de testare poate fi considerată suficientă atunci când este probabil ca factorul de bioconcentrare (BCF) să fie independent de concentrația de testare.
- Un model minimizat al testului cu expunere prin apă în cadrul căruia există posibilitatea unui număr redus de puncte de eșantionare, dacă sunt îndeplinite criterii specifice.

⁽¹⁾ A se vedea apendicele 1 pentru definiții și unități.

- Se măsoară conținutul lipidic al peștelui astfel încât BCF să poată fi exprimat pe baza unui conținut lipidic al peștelui de 5 %.
- Un accent mai mare pe estimarea BCF cinetică (atunci când este posibil) pe lângă estimarea BCF în starea staționară.
- Pentru anumite grupuri de substanțe va fi propus un test de expunere prin alimentație, în cazurile în care se consideră că acest lucru este mai adecvat decât un test de expunere prin apă.
- Se măsoară greutatea peștelui astfel încât BCF_k să poată fi corectat pentru diluția de creștere.

Înainte de a efectua oricare dintre testele de bioacumulare, următoarele informații privind substanța de testat trebuie să fie cunoscute:

- (a) Sensibilitatea tehnicii analitice pentru măsurarea țesutului și a concentrațiilor tisulare și în apă sau în alimentație, atât pentru substanța de testat, cât și pentru posibili metaboliți (a se vedea punctul 65).
- (b) Solubilitatea în apă [MT A.6; (2)]; aceasta se determină în conformitate cu o metodă adecvată pentru plaja de valori (estimată) a solubilității pentru a obține o valoare fiabilă. În cazul substanțelor hidrofobe, în general, aceasta va fi metoda eluției pe coloană.
- (c) Coeficientul de partiție n-octanol-apă, K_{ow} ⁽¹⁾ [MT A.8 (4), A.24 (5), A.23 (6)]; sau alte informații relevante cu privire la comportamentul de partiționare (de exemplu, sorbția lipidelor, K_{oc}); acesta se determină în conformitate cu o metodă adecvată pentru plaja de valori (estimată) a K_{ow} pentru a obține o valoare fiabilă. În cazul substanțelor hidrofobe, în general, aceasta va fi metoda agitării lente [MT A.23 (6)];
- (d) Stabilitatea substanței în apă [hidroliză [MT C.7 (7)]];
- (e) Stabilitatea substanței în alimente (în special în cazul în care se alege o abordare de testare a expunerii prin alimentație);
- (f) Informații cu privire la fototransformare, relevante pentru condițiile de iradiere din test (8);
- (g) Tensiunea superficială (și anume, pentru substanțele la care nu se poate determina $\log K_{ow}$) [MT A.5 (9)];
- (h) Presiunea de vapori [MT A.4 (10)];
- (i) Orice informații privind degradarea biotică sau abiotică în apă, precum (dar fără a se limita la) biodegradabilitatea rapidă [MT C.4 părțile de la II la VII(11), C.29 (12)], după caz;
- (j) Informații cu privire la metaboliți: structura, $\log K_{ow}$, formarea și degradabilitatea, după caz;
- (k) Constanta de disociere acidă (pK_a) pentru substanțele care pot ioniza. În cazul în care este necesar, se ajustează pH-ul apei de testare pentru a se asigura că substanța este în formă neionizată în cadrul testului, dacă este compatibilă cu speciile de pești.

Independent de metoda de expunere selectată sau de schema de prelevare de probe, această metodă de testare descrie o procedură de caracterizare a potențialului de bioacumulare al substanțelor în pești. Cu toate că sunt preferate testele în regim dinamic, sunt permise regimurile semistatice, cu condiția îndeplinirii criteriilor de validitate (a se vedea punctele 24 și 113). În expunerea prin alimentație, sistemul dinamic nu este necesar pentru a menține concentrații apoase ale substanței de testat, dar contribuie la menținerea unui nivel adecvat de concentrații de oxigen dizolvat și la asigurarea apei curate și elimină influența, de exemplu, a produselor de excreție.

⁽¹⁾ Uneori desemnată prin P_{ow} ; determinată printr-o metodă de agitare a flaconului la MT A.8 (4), o metodă HPLC în A.24 (5) și o metodă a agitării lente în MT A.23 (6). O tehnică de generare a coloanei este utilizată uneori pentru determinarea $\log K_{ow}$. Este disponibil un număr limitat de studii care fac uz de această tehnică, în principal pentru bifenili clorurați și dibenzodioxine (de exemplu, Li and Doucette, 1993) (3). În cazul substanțelor care pot ioniza, $\log K_{ow}$ se referă la forma neionizată.

Independent de metoda de testare selectată, în această metodă de testare se furnizează suficiente detalii pentru efectuarea testului, permițând în același timp libertatea adecvată de a adapta modelul experimental la condițiile din laboratoare specifice și de a varia caracteristicile substanțelor de testat. Testul de expunere prin apă se aplică cel mai adecvat substanțelor organice stabile cu valori $\log K_{ow}$ între 1,5 și 6,0 (13), dar poate fi aplicat, de asemenea, substanțelor puternic hidrofobe (având $\log K_{ow} > 6,0$), în cazul în care se poate demonstra o concentrație stabilă și pe deplin dizolvată a substanței de testat în apă. În cazul în care nu se poate demonstra o concentrație stabilă a substanței de testat în apă, un studiu pe o soluție apoasă nu ar fi adecvat, prin urmare, ar fi necesară abordarea prin alimentație pentru testarea substanței în pește (cu toate că interpretarea și utilizarea rezultatelor testului de alimentație pot depinde de cadrul de reglementare). Estimările prealabile ale factorului de bioconcentrare (BCF, uneori denumit K_b) pentru substanțele organice cu valori $\log K_{ow}$ până la aproximativ 9,0 pot fi calculate utilizând ecuația lui Bintein *et al.* (14). Estimarea prealabilă a factorului de bioconcentrare pentru astfel de substanțe foarte hidrofobe poate fi mai mare decât valoarea factorului de bioconcentrare în stare staționară (BCF_{ss}) preconizată a fi obținută din experimente de laborator, în special când se utilizează un model liniar simplu pentru estimarea prealabilă. Parametrii care caracterizează potențialul de bioacumulare includ constanta de viteză de absorbție (k_1) constante de viteză de eliminare, inclusiv constanta de viteză de eliminare (k_2), factorul de bioconcentrare în stare staționară (BCF_{ss}), factorul de bioconcentrare cinetică (BCF_k) și factorul de bioamplificare prin alimentație (BMF) ⁽¹⁾.

Substanțele de testat marcate radioactiv pot facilita analiza probelor de apă, de hrană și de pește și pot fi utilizate pentru a stabili dacă va fi necesară identificarea și cuantificarea metaboliților. În cazul în care se măsoară totalul de reziduu radioactiv singur (de exemplu, prin combustia ori solubilizarea țesuturilor), BCF sau BMF se bazează pe valoarea totală a substanței mamă, toți metaboliții reținuți și, de asemenea, pe carbonul asimilat. Valorile BCF sau BMF care se bazează pe reziduurile radioactive totale nu pot fi comparați, prin urmare, în mod direct cu un factor BCF sau BMF derivat dintr-o analiză chimică particulară exclusiv a substanței mamă. Procedurile de separare, precum TLC, HPLC sau CG ⁽²⁾ pot fi utilizate înainte de analiză în cadrul studiilor cu markeri radioactivi pentru a determina BCF sau BMF pe baza substanței mamă. Atunci când se aplică tehnici de separare, se efectuează identificarea și cuantificarea substanței mamă și a metaboliților relevanți ⁽³⁾ (a se vedea punctul 65) în cazul în care BCF sau BMF urmează să fie bazate pe concentrația substanței mamă în pești și nu pe total de reziduu marcat radioactiv. De asemenea, este posibil să se combine un metabolism al peștilor sau un studiu *in vivo* de distribuție cu un studiu de bioacumulare prin analiza și identificarea reziduurilor tisulare. Posibilitatea metabolismului poate fi prevăzută utilizând instrumente adecvate (de exemplu, OCDE, QSAR Toolbox (15) și programe QSAR care fac obiectul unui drept de proprietate).

Decizia privind efectuarea unui test de expunere prin apă sau de expunere prin alimentație și tipul de configurație se bazează pe factorii de la punctul 3, luați în considerare împreună cu cadrul de reglementare relevant. De exemplu, în cazul substanțelor care au o valoare $\log K_{ow}$ ridicată, dar care prezintă cu toate acestea o solubilitate în apă semnificativă în ceea ce privește sensibilitatea tehnicilor analitice disponibile, se ia în considerare în primă instanță un test de expunere prin apă. Cu toate acestea, este posibil ca informațiile cu privire la solubilitatea în apă să nu fie definitive pentru aceste tipuri de substanțe hidrofobe, astfel încât posibilitatea de a pregăti concentrații apoase stabile, măsurabile dizolvate (nu se permit emulsii stabile), aplicabile unui studiu de expunere prin apă, se investighează înainte de a se lua o decizie cu privire la metoda de testare care trebuie să se utilizeze (16). Nu este posibil să se furnizeze indicații exacte prescriptive în ceea ce privește metoda care trebuie utilizată, pe baza solubilității în apă și a criteriilor de limitare a coeficientului de partiție octanol-apă, având în vedere faptul că alți factori (tehnici analitice, degradare, adsorbție etc.) pot avea o influență semnificativă asupra aplicabilității metodei pentru motivele prezentate anterior. Cu toate acestea, o valoare $\log K_{ow}$ mai mare de 5 și o solubilitate în apă mai mică de aproximativ 0,01-0,1 mg/l marchează plaja de valori a substanțelor la care testarea prin expunere prin apă poate deveni din ce în ce mai dificilă.

Se iau în considerare alți factori care pot influența alegerea testului, inclusiv aparatul și potențialul de absorbție al substanței în vasele de testare, stabilitatea acesteia în soluție apoasă în comparație cu stabilitatea acesteia în hrana pentru pești (17) (18) etc.

⁽¹⁾ A se vedea apendicele 1 pentru definiții și unități.

⁽²⁾ TLC: cromatografie în strat subțire; HPLC: cromatografie de înaltă performanță; CG: cromatografie în fază gazoasă.

⁽³⁾ În anumite cadre de reglementare, analiza metaboliților poate fi obligatorie atunci când sunt îndeplinite anumite condiții (a se vedea punctul 65).

Informații privind astfel de aspecte practice pot fi disponibile din alte studii efectuate pe apă. Informații suplimentare privind evaluarea aspectelor legate de performanța studiilor de bioacumulare sunt disponibile în referințele bibliografice [de exemplu (19)].

În cazul substanțelor pentru care solubilitatea sau menținerea concentrației în apă, precum și analiza acestor concentrații nu reprezintă restricții în calea realizării unei metode cu expuneri prin apă, se preferă această metodă pentru determinarea potențialului de bioconcentrare al substanței. În orice caz, se verifică dacă concentrația (concentrațiile) de expunere prin apă care urmează să fie aplicată (aplicate) se încadrează în solubilitatea apoasă în mediul de testare. Se pot utiliza diferite metode pentru menținerea stabilității concentrațiilor substanței de testat dizolvate, cum ar fi utilizarea de soluții mamă sau sisteme de dozare pasive (de exemplu, metoda eluției pe coloană), atât timp cât se poate demonstra că pot fi menținute concentrațiile stabile și mediile de testare nu sunt modificate față de cele recomandate la punctul 27.

În cazul substanțelor foarte hidrofobe ($\log K_{ow} > 5$ și solubilitate sub $\sim 0,01-0,1$ mg/l), testarea prin expunere prin apă poate deveni din ce în ce mai dificilă. Motivele limitărilor pot fi faptul că o concentrație apoasă nu se poate menține la un nivel considerat a fi suficient de constant (de exemplu, din cauza sorbției la sticla recipientelor de expunere sau absorbției rapide de către pește) sau faptul că acele concentrații apoase care urmează să fie aplicate sunt atât de scăzute încât se află în plaja de valori sau sub limita analitică a cuantificării⁽¹⁾. În cazul acestor substanțe foarte hidrofobe, se recomandă testul prin alimentație, cu condiția ca testul să fie în conformitate cu cadrul de reglementare relevant și cu necesitățile în materie de evaluare a riscurilor.

În cazul surfactanților, se ia în considerare dacă testul de bioacumulare prin apă este fezabil, ținând cont de proprietățile substanței; în caz contrar, studiul prin alimentație este probabil mai adecvat. Surfactanții sunt agenți care acționează la suprafață, care scad tensiunea interfacială între două lichide. Natura amfifilică a acestora (și anume, aceștia conțin atât o parte hidrofilă, cât și o parte hidrofobă) îi face să se acumuleze la interfețe precum interfața apă-aer, interfața apă-hrană și pereții din sticlă, ceea ce îngreunează determinarea concentrației apoase a acestora.

Testul prin alimentație poate să evite unele aspecte de expunere pentru amestecurile complexe cu componente cu limite de solubilitate în apă diferite prin faptul că expunerea la toate componentele amestecului este mai probabilă decât în metoda prin apă [a se vedea (20)].

Se remarcă faptul că abordarea prin alimentație produce un factor de bioamplificare prin alimentație (BMF) mai degrabă decât un factor de bioconcentrare (BCF)⁽²⁾. Există abordări disponibile pentru a estima un factor de bioconcentrare cinetică (BCF_k) pe baza datelor generate în cadrul studiului prin alimentație (astfel cum s-a discutat în apendicele 8), dar aceste abordări se utilizează cu precauție. În general, aceste abordări presupun cinetică de ordinul întâi și sunt aplicabile numai anumitor categorii de compuși. Este puțin probabil ca astfel de abordări să poată fi aplicate surfactanților (a se vedea punctul 12).

O configurație de testare cu expunere minimă prin apă cu mai puține puncte de prelevare pentru reducerea numărului de animale și/sau resurse (a se vedea punctele începând de la 83) se aplică numai substanțelor pentru care există motive să se preconizeze faptul că absorbția și eliminarea vor urmări aproximativ cinetica de ordinul întâi (și anume, în general, substanțe organice neionizate, a se vedea punctul 88).

⁽¹⁾ În general, concentrațiile măsurate în apă în timpul fazei de absorbție trebuie să fie cu cel puțin un ordin de mărime peste limita de cuantificare, astfel încât mai mult de un timp de înjumătățire a conținutului corporal să poată fi măsurat în faza de eliminare a studiului.

⁽²⁾ A se vedea apendicele 1 pentru definiții și unități.

C.13 – I Test de bioconcentrare în pești cu expunere prin apă**PRINCIPIUL TESTULUI**

Testul constă în două faze: faza de expunere (absorbție) și faza de post-expunere (eliminare). În timpul fazei de absorbție, un grup de pești dintr-o singură specie se expune la substanța de testat la una sau mai multe concentrații selectate, în funcție de proprietățile substanței de testat (a se vedea punctul 49). Ulterior aceștia se transferă într-un mediu care nu conține substanță de testat pentru faza de eliminare. O fază de eliminare este întotdeauna necesară, în afară de cazul în care absorbția substanței în timpul fazei de absorbție a fost nesemnificativă. Se urmărește concentrația substanței de testat în/pe pești (sau în țesuturile specificate ale acestora) pe parcursul celor două faze ale testului. În plus față de grupul expus, se menține la condiții identice, excepție făcând absența substanței de testat, un grup martor de pești, pentru a raporta posibilele efecte adverse observate la testul de bioconcentrare la un grup martor congruent și pentru obținere concentrații de bază ale substanței de testat ⁽¹⁾.

În testul cu expunere prin apă, faza de absorbție durează, de regulă, 28 de zile. Dacă este necesar, durata poate fi prelungită (a se vedea punctul 18) sau redusă în cazul în care se demonstrează că starea de echilibru a fost atinsă mai devreme (a se vedea apendicele 1, secțiunea Definiții și unități). Utilizând ecuațiile din apendicele 5 se poate efectua o estimare a duratei fazei de absorbție și a timpului necesar pentru obținerea stării staționare. Ulterior se începe perioada de eliminare, când peștii nu mai sunt expuși la substanța de testat, cu transferarea peștilor în același mediu, dar fără substanța de testat, într-un vas curat. Acolo unde este posibil, se calculează factorul de bioconcentrare, de preferință atât ca raportul concentrației în pește (C_p), cât și în apă (C_w) în starea staționară (BCF_{ss} ; a se vedea apendicele 1, secțiunea Definiții și unități), care este estimat ca raportul dintre constanta de viteză de absorbție (k_1) și de eliminare (k_2), presupunând o cinetică de ordinul întâi ⁽²⁾.

În cazul în care nu se atinge o stare staționară în 28 de zile, fie se calculează BCF cu ajutorul abordării cinetice (a se vedea punctul 38), fie se poate prelungi faza de absorbție. În cazul în care acest lucru conduce la o fază de absorbție impractic de lungă pentru a atinge starea staționară (a se vedea punctele 37 și 38, apendicele 5), se preferă abordarea cinetică. În mod alternativ, în cazul substanțelor puternic hidrofobe se ia în considerare efectuarea unui studiu prin alimentație ⁽³⁾, cu condiția ca testul cu expunere prin alimentație să fie în concordanță cu cadrul de reglementare relevant.

Se calculează constanta de viteză de absorbție, constanta de viteză de eliminare (pierdere) (sau constantele, atunci când sunt implicate mai multe modele complexe), factorul de bioconcentrare (stare staționară și/sau cinetică) și, dacă este posibil, limitele de încredere pentru fiecare dintre acești parametri pornind de la modelul care descrie cel mai bine concentrațiile măsurate ale substanței de testat în pești și în apă (a se vedea apendicele 5).

Creșterea masei peștelui în timpul testului va conduce la o scădere a concentrației substanței de testat din peștii care cresc (așa-numita diluție a creșterii) și, prin urmare, BCF cinetică va fi subestimat dacă nu este corectat pentru a lua în considerare creșterea (a se vedea punctele 72 și 73).

BCF se bazează pe concentrația totală în pești (și anume, în funcție de greutatea totală umedă a peștilor). Cu toate acestea, pentru anumite scopuri, pot fi utilizate țesuturi sau organe specifice (de exemplu, mușchi, ficat) în cazul în care peștii sunt suficient de mari sau dacă aceștia pot fi separați în părți comestibile (fileuri) și necomestibile (viscere). Având în vedere faptul că, pentru numeroase substanțe organice, există o relație clară care leagă potențialul de bioconcentrare și caracterul hidrofob, va exista și o relație corespunzătoare între conținutul lipidic la peștii de testat și bioconcentrațiile observate pentru aceste substanțe. Prin urmare, pentru a elimina această variabilă din rezultatele testelor cu substanțe foarte lipofile (și anume, cu $\log K_{ow} > 3$), bioconcentrarea se exprimă ca normalizată la un pește cu un conținut lipidic de 5 % (pe baza greutății corporale totale umede), în plus față de cea rezultată în mod direct din studiu. Acest lucru este necesar pentru a oferi o bază din care rezultatele pentru diferite substanțe și/sau specii de testat pot fi comparate între ele. Cifra de 5 % conținut lipidic a fost utilizată pe scară largă deoarece aceasta reprezintă media conținutului lipidic al peștelui utilizat în mod obișnuit în cadrul acestei metode de testare (21).

⁽¹⁾ Pentru majoritatea substanțelor de testat, în mod ideal nu trebuie să existe nicio detecție în apa martor. Concentrațiile de bază trebuie să fie relevante numai pentru materialele naturale (de exemplu, unele metale) și substanțele care sunt omniprezente în mediul înconjurător.

⁽²⁾ În cazul în care cinetica de ordinul întâi nu este respectată în mod evident, se utilizează modele mai complexe (a se vedea referințele din apendicele 5 și se cere opinia unui biostatistician).

⁽³⁾ Absorbția poate fi limitată de concentrații de expunere scăzute, din cauza solubilității scăzute în apă la testul de bioconcentrare, în timp ce concentrații de expunere mult mai ridicate pot fi atinse cu ajutorul testului prin alimentație.

INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA DE TESTARE

În plus față de proprietățile substanței de testare prezentate în secțiunea Introducere (punctul 3), alte informații necesare sunt toxicitatea speciilor de pești care urmează să fie utilizate în cadrul testului, de preferință CL_{50} asimptotică (și anume, independentă de timp) și/sau toxicitatea estimată din teste pe pește estimate pe termen lung [de exemplu, MT C.47(22), C.15 (23), C.14 (24)].

Se utilizează o metodă adecvată, cu exactitatea, precizia și sensibilitatea cunoscute pentru a cuantifica substanța în soluțiile de testare și în materialul biologic, precum și informații precise legate de prepararea și păstrarea probelor. Trebuie să se cunoască, de asemenea, limita de cuantificare analitică a substanței de testat, atât în apă, cât și în țesuturile peștilor. Atunci când se utilizează o substanță de testat marcată radioactiv, aceasta trebuie să aibă cea mai mare puritate posibilă (de exemplu, de preferință, > 98 %) și trebuie să se cunoască procentajul de radioactivitate asociată impurităților.

VALIDITATEA TESTULUI

Pentru ca un test să fie valid, se aplică următoarele condiții:

Variația de temperatură a apei este mai mică de ± 2 °C, deoarece variațiile mari pot afecta parametrii biologici relevanți pentru absorbție și eliminare și pot cauza stres pentru animale.

Concentrația oxigenului dizolvat nu coboară sub 60 % din nivelul de saturație;

Concentrația substanței de testat în vase este menținută la ± 20 % din media valorilor măsurate în timpul fazei de absorbție;

Concentrația substanței de testat este mai mică decât limita acestora de solubilitate în apă, ținând cont de efectul pe care apa de testare îl poate avea asupra solubilității eficiente ⁽¹⁾;

Mortalitatea sau alte efecte adverse/maladii înregistrate atât la peștii martor, cât și la cei tratați este mai mică de 10 % la sfârșitul testului; atunci când testul se prelungește pe mai multe săptămâni sau luni, mortalitatea sau alte efecte adverse apărute la cele două grupe de pești trebuie să fie mai mică de 5 % pe lună și să nu depășească 30 % în total. Diferențele semnificative în ceea ce privește creșterea medie între grupul de testare și cel martor de pești de la care au fost prelevate eșantioane ar putea fi o indicație a unui efect toxic al substanței de testat.

SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Utilizarea de substanțe de referință cu un potențial de bioconcentrare cunoscut și metabolism scăzut ar putea fi utilă pentru verificarea procedurii experimentale, dacă este necesar (de exemplu, în cazul în care un laborator nu are experiență anterioară în ceea ce privește testul sau condițiile experimentale au fost modificate).

DESCRIEREA METODEI

Aparatură

Se acordă atenție deosebită la evitarea utilizării materialelor – pentru toate componentele echipamentelor – care pot dizolva, absoarbe sau leviga și care pot avea un efect advers asupra peștilor. Se pot utiliza bazine standard rectangulare sau cilindrice, realizate din material chimic inert și cu o capacitate adecvată, în concordanță cu rata de încărcare (a se vedea punctul 43). Se reduce la minimum utilizarea de țevi din plastic flexibil. Se utilizează politetrafluoretilena, oțelul inoxidabil și/sau sticla. Experiențele au dovedit că, pentru substanțele cu coeficient mare de adsorbție precum piretrinele de sinteză, poate fi necesară sticla silanizată. În astfel de cazuri, echipamentul se aruncă după utilizare. Este de preferat să se expună sistemele de testare la concentrații ale substanței de testat care urmează să fie utilizate în cadrul studiului atât timp cât este necesar pentru a demonstra menținerea de concentrații de expunere stabile înainte de introducerea organismelor de testat.

⁽¹⁾ În cazul substanțelor multicomponente, UVCB și al amestecurilor, se ia în considerare solubilitatea în apă pentru fiecare componentă relevantă pentru a determina concentrațiile de expunere adecvate.

Apă

În general, se utilizează apă naturală, obținută dintr-o sursă nepoluată și de calitate uniformă. Cu toate acestea, apa reconstituită (și anume, apă demineralizată cu anumite substanțe nutritive adăugate în cantități cunoscute) poate fi mai adecvată pentru a garanta o calitate uniformă în timp. Apă de diluție, care este apa care se amestecă cu substanța de testat înainte de a fi introdusă în vasul de testare (a se vedea punctul 30), trebuie să fie de o calitate care să permită supraviețuirea speciei de pești selectată, în perioada de aclimatizare și în cursul testului, fără ca aceștia să prezinte vreun aspect sau comportament anormal. În mod ideal, se demonstrează faptul că speciile supuse testului pot supraviețui, crește și reproduce în apa de diluție (de exemplu, în cultură de laborator sau printr-un test de toxicitate asupra unui ciclu biologic). Apa de diluție se caracterizează cel puțin prin pH, duritate, materii solide totale, carbon organic total (COT ⁽¹⁾) și, de preferință, de asemenea, prin conținutul de amoniu, nitrați și alcalinitate, iar pentru speciile marine, prin salinitate. Parametrii optimi pentru pești nu sunt pe deplin cunoscuți, dar apendicele 2 indică concentrațiile maxime recomandate în legătură cu un anumit număr de parametri pentru apele proaspete și marine utilizate la testare.

Apa de diluție trebuie să fie de calitate constantă în timpul perioadei de testare. Valoarea pH-ului trebuie să fie cuprinsă între valorile 6,0-8,5 la începutul testului, dar pe durata unui test dat aceasta trebuie să se încadreze în interiorul unei plajă de $\pm 0,5$ unități de pH. Pentru a asigura faptul că apa de diluție nu influențează în mod excesiv rezultatele testului (de exemplu, prin complexarea substanței de testat) sau că nu afectează în mod negativ performanțele stocului de pești, se prelevează în mod regulat probe pentru analiză, cel puțin la începutul și la sfârșitul testului. Determinarea conținutului de metale grele (de exemplu, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, și Ni), a anionilor și cationilor principali (de exemplu, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , K^{+} , Cl^{-} , and SO_4^{2-}), a pesticidelor (de exemplu, pesticidele organofosforice totale și cele organoclorurate totale), a carbonului organic total și a solidelor în suspensie se efectuează, de exemplu, la fiecare trei luni, în cazul în care apa de diluție este cunoscută a fi relativ constantă în ceea ce privește calitatea. În cazul în care s-a demonstrat calitatea constantă a apei de diluție pe o perioadă de cel puțin un an, determinările pot fi mai puțin frecvente și intervalele se pot prelungi (de exemplu, la fiecare șase luni).

Conținutul de particule naturale, precum și de carbon organic total din apa de diluție trebuie să fie cât mai mic posibil, pentru a evita adsorbția substanței de testat în materiile organice, ceea ce i-ar putea reduce biodisponibilitatea și, prin urmare, conduce la o subestimare a BCF. Valoarea maximă admisă este de 5 mg/l pentru particulele de materie (materia uscată, care nu trece printr-un filtru de 0,45 μm) și de 2 mg/l pentru carbonul organic total (a se vedea apendicele 2). Dacă este necesar, se filtrează apa de diluție înainte de utilizare. Se menține la un nivel cât mai scăzut posibil contribuția la conținutul de carbon organic din apa de testat de la peștii testați (excreții) și din reziduurile alimentare (a se vedea punctul 46).

Soluții de testat

Se prepară o soluție stoc de substanță de testat la o concentrație adecvată. De preferință, soluția stoc se prepară prin simplă amestecare ori agitare a substanței de testat în apa de diluție. O alternativă care poate fi în unele cazuri adecvată este utilizarea unui sistem de dozare de desorbție în fază solidă. Nu se recomandă utilizarea solvenților sau a dispersanților (agenți de dizolvare) [a se vedea (25)]; cu toate acestea, utilizarea acestor materiale poate fi acceptabilă pentru a obține o soluție stoc de concentrație adecvată, dar se efectuează orice efort pentru a reduce la minimum utilizarea unor astfel de materiale și nu se depășește concentrația critică a micelilor acestora (dacă este cazul). Solvenții care se pot utiliza sunt acetona, etanolul, metanolul, dimetilformamida și trietilen glicolul; dispersanții care au fost utilizați sunt Tween 80, metilceluloză 0,01 % și HCO-40. Concentrația solventului în mediul de testare final trebuie să fie aceeași în toate tratamentele (și anume, indiferent de concentrația substanței de testat) și nu trebuie să depășească pragurile de toxicitate corespunzătoare determinate pentru solvent în condițiile de testare. Nivelul maxim este o concentrație de 100 mg/l (sau 0,1 ml/l). Este puțin probabil că o concentrație a solventului de 100 mg/l va modifica în mod semnificativ concentrația maximă dizolvată a substanței de testat care poate fi obținută în mediu (25). Contribuția solventului (împreună cu substanța de testat) la conținutul total de carbon organic din apa de testare trebuie să fie cunoscută. Pe parcursul testului, concentrația de carbon organic total în vasele de testare nu trebuie să depășească concentrația de carbon organic provenit din substanța de testat și solventul sau agentul de solubilizare ⁽²⁾, dacă se utilizează, cu mai mult de 10 mg/l (± 20 %). Conținutul de materie

⁽¹⁾ Carbon organic total (COT) include carbon organic din particule și carbon organic dizolvat, $\text{COT} = \text{COP} + \text{COD}$.

⁽²⁾ Cu toate că nu se recomandă în general, în cazul în care se utilizează un solvent sau un agent dizolvare, se adaugă carbonul organic provenit din acest agent la carbonul organic din substanța de testat pentru a se evalua concentrația de carbon organic din vasele de testare.

organică poate avea un efect semnificativ asupra cantității de substanță de testat dizolvată în mod liber în timpul experiențelor cu reînnoire continuă asupra peștilor, în special pentru substanțele puternic lipofile. Microextracția în fază solidă (a se vedea punctul 60) poate furniza informații importante cu privire la raportul dintre compușii legați și cei dizolvați în mod liber, dintre care se presupune că cei din urmă reprezintă partea biodisponibilă. Concentrația substanței de testat trebuie să fie sub limita de solubilitate a substanței de testat în mediile de testare în pofida utilizării unui solvent sau un agent de dizolvare. Se acordă atenție deosebită la utilizarea solvenților cu biodegradabilitate rapidă având în vedere faptul că aceștia pot cauza probleme privind creșterea bacteriană în testelor cu reînnoire continuă. În cazul în care nu este posibil să se prepare o soluție stoc fără utilizarea unui agent de solubilizare, se ia în considerare gradul de adecvare al unui studiu de expunere prin apă, spre deosebire de un studiu de expunere prin alimentație.

În cazul testelor cu reînnoire continuă, este necesară utilizarea de aparatură care să disperseze și să dilueze în permanență o soluție stoc de substanță de testat (cum ar fi pompe dozatoare, diluator proporțional, sistem saturator) sau un sistem de dozare de desorbție în fază solidă pentru a aduce concentrațiilor de testare în camere. De preferință, se permit cel puțin cinci volume de înlocuitor pe zi, pentru fiecare cameră de testare. De preferință, se utilizează o metodă cu reînnoire continuă, însă în cazul în care aplicarea acesteia nu este posibilă (de exemplu, atunci când organismele din cadrul testului suferă efecte adverse), se poate utiliza o tehnică semistatică, în cazul în care se îndeplinesc criteriile de validare (a se vedea punctul 24). Se verifică debitul soluțiilor stoc și al apei de diluție, atât cu 48 de ore înainte, cât și în cursul testului, cel puțin zilnic. Se include în această verificare determinarea debitului în fiecare cameră de testare și se asigură faptul că acesta nu variază cu mai mult de 20 % atât în fiecare, cât și între acestea.

Selecția speciilor

Printre criteriile importante de alegere a speciilor figurează cele privind ușurința procurării, dimensiunea și posibilitatea întreținerii ușoare în laborator. Alte criterii pentru selectarea speciilor de pești includ importanța în materie de agrement, comerț, ecologie, precum și sensibilitatea comparabilă, utilizarea cu succes în trecut etc. În apendicele 3 sunt prezentate specii de testare recomandate. Se pot utiliza alte specii, dar procedura de testare ar putea necesita adaptare pentru a furniza condiții de testare adecvate. Într-un asemenea caz, se expune justificarea alegerii speciilor și a metodei experimentale utilizate. În general, utilizarea unor specii de pești mai mici va scurta timpul până la starea staționară, dar ar putea fi necesari mai mulți pești (eșantioane) pentru a analiza în mod adecvat conținutul lipidic și concentrațiile de substanță de testat din pești. În plus, este posibil ca diferențele în ceea ce privește frecvența respiratorie și metabolismul între peștii tineri și cei mai în vârstă să poată împiedica realizarea de comparații între rezultatele obținute din diferite teste și specii de testare. Se remarcă faptul că speciile de pești testate în timpul unei etape de viață (juvenilă) cu creștere rapidă pot complica interpretarea datelor.

Păstrarea peștilor (relevantă pentru expunerea prin apă și prin alimentație)

Se aclimatizează populația de pești timp de cel puțin două săptămâni, în apă (a se vedea punctul 28) la temperatura de testare, cu furnizarea de hrană suficientă (a se vedea punctul 45). Atât apa, cât și hrana trebuie să fie de același tip cu cele utilizate în timpul testului.

După o perioadă de instalare de 48 de ore, se înregistrează rata mortalității și se aplică următoarele criterii:

- Mortalitate mai mare de 10 % din populație, în șapte zile: se renunță la întregul lot;
- Mortalitate cuprinsă între 5 și 10 % din populație, în șapte zile: se prelungește perioada de aclimatizare cu șapte zile – în cazul în care mortalitatea este mai mare de 5 % în timpul celei de a doua perioade de șapte zile, se renunță la întregul lot;
- Mortalitate mai mică de 5 % din populație, în șapte zile: se acceptă lotul.

Peștii utilizați pentru teste nu trebuie să prezinte maladii și nici anomalii observabile. Se elimină toți peștii bolnavi. Peștii nu trebuie să primească tratament pentru boală în cele două săptămâni anterioare testului sau în timpul testului.

DESFĂȘURAREA TESTULUI

Test preliminar

Se poate dovedi utilă o experimentare preliminară, pentru optimizarea condițiilor de execuție ale experimentului real, în ceea ce privește, de exemplu, selecția concentrațiilor substanței de testat, duratele fazelor de absorbție și de eliminare sau pentru a determina dacă este necesară efectuarea unui test complet. Conceperea testului preliminar trebuie să fie de asemenea natură încât să se obțină informațiile necesare. Se poate lua în considerare dacă un test limitat poate fi suficient pentru a obține un BCF sau dacă este necesar un studiu complet (a se vedea punctele 83-95 privind testul minimizat).

Condiții de expunere*Durata fazei de absorbție*

Se poate estima durata fazei de absorbție, cu ajutorul unei experimentări preliminare (de exemplu, pornind de la un studiu anterior sau de la un studiu de acumulare pe o substanță înrudită structural) sau pornind de la anumite relații empirice, bazate pe ceea ce se cunoaște despre solubilitatea în apă ori utilizând coeficientul de partiție octanol/apă al substanței de testat (cu condiția ca absorbția să urmeze cinetica de ordinul întâi, a se vedea appendicele 5).

Faza de absorbție va dura 28 de zile, exceptând cazul în care se poate demonstra că a fost atins un echilibru mai devreme (a se vedea appendicele 1, secțiunea definiții și unități). Se ajunge la o stare staționară în reprezentarea grafică a substanței de testat în pești (C_p) în funcție de timp, atunci când curba devine paralelă cu axa timpului și trei analize succesive ale C_p efectuate pe eșantioane prelevate la intervale de cel puțin două zile se încadrează în limita de $\pm 20\%$ și nu există nicio creștere semnificativă a C_p în timp între prima și ultima analiză succesivă. Atunci când se analizează probe reunite, se efectuează minim patru analize succesive. În cazul în care substanțele experimentale au caracteristici de absorbție lente, este preferabil să se opteze pentru intervale săptămânale. În cazul în care nu s-a ajuns la starea staționară în decurs de 28 de zile, fie se calculează BCF utilizând numai abordarea cinetică, abordare care nu este dependentă de atingerea stării staționare, sau se poate prelunge faza de absorbție, efectuându-se alte măsurători până la obținerea stării staționare sau timp de 60 de zile, optându-se pentru alternativa cea mai scurtă. De asemenea, concentrația substanței de testat în pești la finalul fazei de absorbție trebuie să fie suficient de mare pentru a se asigura o estimare fiabilă a k_2 din faza de eliminare. În cazul în care nicio absorbție semnificativă nu este prezentă după 28 zile, testul poate fi oprit.

Durata fazei de eliminare

Pentru substanțele care urmează cinetica de ordinul întâi, în general, jumătate din durata fazei de absorbție este suficientă pentru a se produce o reducere convenabilă (de exemplu, 95 %) a conținutului corporal de substanță de testat (a se vedea explicațiile privind estimarea, în appendicele 5). În cazul în care timpul necesar pentru realizarea unei pierderi de 95 % este prea lung, depășind, de exemplu, de două ori durata fazei de absorbție (și anume, mai mult de 56 de zile), se poate opta pentru o perioadă mai scurtă (de exemplu, până când concentrația substanței de testat devine mai mică cu 10 % din concentrația la starea staționară). Cu toate acestea, pot fi necesare perioade de eliminare mai lungi pentru substanțele cu scheme de absorbție și eliminare mai complexe decât modelul peștilor în compartiment unic, după o cinetică de ordinul întâi. În cazul în care se observă și/sau anticipează astfel de modele complexe, se recomandă solicitarea de consultanță din partea unui biostatistician și/sau specialist în farmacocinetică pentru a se asigura o configurație de testare adecvată. Pe măsură ce perioada de eliminare se prelungește, numărul de pești pentru prelevare poate deveni o limitare și diferențele de creștere dintre pești pot influența rezultatele. Perioada va fi controlată, de asemenea, prin intermediul perioadei în care concentrația substanței de testat din pești se situează deasupra limitei analitice de cuantificare.

Numărul de pești pentru experiment

Alegerea numărului de pești pentru concentrația de testare se face astfel încât să fie disponibili cel puțin patru pești pentru fiecare eșantion, la fiecare punct de prelevare. Peștii se reunesc numai în cazul în care analiza exemplarelor individuale nu este fezabilă. În cazul în care se intenționează o mai mare precizie în interpolare (și parametrii derivați) sau în cazul în care sunt necesare studii asupra metabolismului (de exemplu, pentru a distinge între metaboliți și substanța mamă atunci când se utilizează substanțe de testat marcate radioactiv) vor fi necesari mai mulți pești pentru fiecare punct de prelevare. Se determină conținutul lipidic utilizând același material biologic care se utilizează la determinarea concentrației substanței de testat. În cazul în care acest lucru nu este realizabil, ar putea fi necesari pești suplimentari (a se vedea punctele 56 și 57).

În cazul în care se utilizează pești adulți (și anume, maturi din punct de vedere sexual), aceștia nu trebuie să fie într-o stare de reproducere sau reproduși recent (și anume, deja au depus icrele), fie înainte sau în timpul testului. Se raportează, de asemenea, dacă în cadrul experimentului se utilizează masculi sau femele sau ambele sexe. În cazul în care se utilizează ambele sexe, înainte de expunere se verifică ca diferențele în ceea ce privește creșterea și conținutul lipidic să fie nesemnificative, în special în cazul în care se anticipează că va fi necesară utilizarea de loturi comune de masculi și femele cu scopul de a asigura concentrații de substanță și/sau conținut lipidic detectabile.

În cadrul oricărui test, se selectează pești de greutate asemănătoare, astfel încât cei mai mici nu vor fi mai mici de două treimi din greutatea peștilor celor mai mari. Toți vor aparține aceleiași clase de vârstă și vor proveni din aceeași sursă. Având în vedere faptul că greutatea și vârsta unui pește pot avea un efect semnificativ asupra valorilor BCF (12), aceste informații se înregistrează cu acuratețe. Este indicat ca un subeșantion din populația de pești să fie cântărit cu puțin timp înainte de începerea testului, pentru a estima greutatea medie (a se vedea punctul 61).

Încărcarea

Se utilizează raporturi ridicate de apă/pește în scopul de a minimiza scăderea concentrației substanței de testat în apă datorită adăugării peștilor la începutul testului și, de asemenea, pentru a evita diminuarea concentrației în oxigen dizolvat. Este important ca regimul de încărcare să fie adaptat speciei utilizate pentru testare. În orice caz, în mod normal se recomandă un regim de încărcare de 0,1-1,0 g de pește (greutate umedă) la litru de apă pe zi. Se pot utiliza regimuri de încărcare mai mari în cazul în care se demonstrează că se poate menține concentrația necesară de substanță de testat în limitele de $\pm 20\%$ și concentrația oxigenului dizolvat nu coboară sub 60 % din nivelul de saturare (a se vedea punctul 24).

La alegerea regimului de încărcare se ține cont de habitatul normal al speciilor de pești. De exemplu, peștii bentonici pot necesita un acvariu cu suprafața fundului mai mare, în comparație cu același volum de apă pentru speciile pelagice.

Alimentația

Pe parcursul perioadelor de aclimatizare și de testare, peștii se hrănesc după un regim adecvat, cu un conținut cunoscut în lipide și proteine totale, într-o cantitate suficientă pentru a-i menține în stare bună de sănătate și pentru a menține greutatea corporală (într-o oarecare măsură, creșterea este permisă). Peștii se hrănesc zilnic în perioadele de aclimatizare și de testare, la un nivel prestabilit în funcție de speciile utilizate, condițiile experimentale și valorile calorice ale produsului alimentar (de exemplu, în cazul păstrăvului-curcubeu, între aproximativ 1-2 % din greutatea corporală pe zi). Rata alimentară se selectează astfel încât să se evite creșterea rapidă și mărirea considerabilă a conținutului lipidic. Pentru a menține aceeași rată de alimentare, se recalculează în mod corespunzător cantitatea de hrană, de exemplu, o dată pe săptămână. Pentru acest calcul, greutatea peștilor din fiecare cameră de testare se va estima pornind de la greutatea peștilor eșantionați cel mai recent din respectiva cameră. Nu se cântăresc peștii rămași în cameră.

Hrana neconsumată și excrementele se sifonează zilnic din camerele de testare, la puțin timp după alimentare (de la 30 minute la o oră). Camerele se mențin cât mai curate posibil, în cursul întregului experiment, astfel încât concentrația de materie organică să fie cât mai mică (a se vedea punctul 29) având în vedere faptul că prezența carbonului organic poate limita biodisponibilitatea substanței de testat (12).

Având în vedere faptul că numeroase alimente sunt derivate din făină de pește, se garantează faptul că hrana nu va influența rezultatele testului și nu va induce efecte adverse, de exemplu, prin conținutul (urme) de pesticide, metale grele și/sau substanța de testat în sine.

Iluminare și temperatură

Se recomandă o fotoperioadă de la 12 la 16 ore, la temperatura ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) corespunzătoare speciei utilizate (a se vedea appendicele 3). Tipul și caracteristicile iluminării vor fi clar definite. Se va ține cont de eventualele fototransformări ale substanței de testat, în condițiile de iradiere ale studiului. Se utilizează iluminare adecvată pentru a se evita expunerea peștilor la fotoproduse nenaturale. În unele cazuri poate fi esențială utilizarea de filtre pentru blocarea radiației UV mai mici de 290 nm.

Concentrațiile de testare

Testul a fost conceput inițial pentru substanțe organice nepolare. Pentru acest tip de substanțe, expunerea peștilor la o singură concentrație se consideră a fi suficientă, având în vedere faptul că nu se preconizează efecte ale concentrației, cu toate că pot fi necesare două concentrații pentru cadrul de reglementare relevant. În cazul în care se testează substanțe din afara acestui domeniu sau se cunosc alte indicații privind posibilitatea dependenței de concentrație, testul se efectuează cu două sau mai multe concentrații. În cazul în care se testează o singură concentrație, se furnizează justificarea pentru utilizarea unei singure concentrații (a se vedea punctul 79). De asemenea, concentrația testată trebuie să fie cât mai scăzută posibil din punct de vedere tehnic sau practic (și anume, să nu fie apropiată de limita de solubilitate).

În unele cazuri, se poate anticipa faptul că bioconcentrarea substanței depinde de concentrația apei (de exemplu, în cazul metalelor, unde absorbția în pește pot fi reglementată, cel puțin parțial). Într-un astfel de caz, este necesară testarea a cel puțin două concentrații, dar de preferință mai multe (a se vedea punctul 49) care sunt relevante din punct de vedere al mediului. De asemenea, în cazul substanțelor la care concentrațiile de testat trebuie să fie aproape de limita de solubilitate, din motive practice, se recomandă testarea a cel puțin două concentrații, deoarece acest lucru poate furniza o imagine de ansamblu asupra fiabilității concentrațiilor de expunere. Alegerea concentrațiilor de testare trebuie să includă concentrația realistă din punct de vedere al mediului, precum și concentrația relevantă pentru scopul evaluării specifice.

Concentrația (concentrațiile) substanței de testat se selectează pentru a fi sub nivelul acestuia (acestora) de efect cronic sau 1 % din CL_{50} acută asimptotică, într-o plajă de valori relevantă din punct de vedere al mediului și cu cel puțin un ordin de mărime mai mare decât limita de cuantificare în apă, prin metoda analitică utilizată. Cea mai mare concentrație de testare admisă poate fi determinată, de asemenea, împărțind CL_{50} la 96 de ore printr-un raport procentual acut/cronic (de exemplu, rapoartele procentuale adecvate pentru anumite substanțe sunt aproximativ 3, dar câteva sunt peste 100). În cazul în care se utilizează o a doua concentrație, aceasta trebuie să difere de cea superioară printr-un factor de zece. În cazul în care acest lucru nu este posibil din cauza criteriului de toxicitate (care limitează concentrația maximă de substanță de testat) și a limitei analitice (care limitează concentrația minimă de substanță de testat), se poate utiliza un factor inferior celui de zece și se ia în considerare utilizarea de substanță de testat marcată radioactiv (de cea mai mare puritate posibilă, de exemplu, de preferință, > 98 %). Se acordă atenție deosebită ca niciuna dintre concentrațiile utilizate să nu depășească limita de solubilitate a substanței de testat în mediile de testare.

Martori

Apa de diluție martor sau, dacă este necesar (a se vedea punctele 30 și 31), un martor conținând agentul de dizolvare se testează în plus față de seria de teste.

Frecvența de măsurare a calității apei

În timpul testului, se măsoară oxigenul dizolvat, COT, pH-ul și temperatura în toate vasele de testare și martor. Durețea totală și salinitatea (dacă are relevanță) se măsoară la martor (martori) și într-un vas. În cazul în care se testează două sau mai multe concentrații, se măsoară acești parametri la concentrația mai mare (sau ce mai mare). Se măsoară oxigenul dizolvat și salinitatea (dacă are relevanță) de cel puțin trei ori – la începutul, mijlocul și sfârșitul perioadei de absorbție – și cel puțin o dată pe săptămână, în perioada de eliminare. Se măsoară COT la începutul testului (24 și 48 de ore înainte de inițierea fazei de absorbție), înainte de adăugarea peștilor și cel puțin o dată pe săptămână, în perioadele de absorbție și de eliminare. Temperatura se măsoară și se înregistrează zilnic, pH-ul la începutul și la sfârșitul fiecărei perioade, iar duritatea o dată pentru fiecare test. De preferință, temperatura se supraveghează în mod continuu, cel puțin într-unul dintre vase.

Eșantionarea și analiza peștilor și a apei

Programarea eșantionării peștilor și a apei

Se eșantionează apa din camerele de testare pentru determinarea concentrației substanței de testat înainte de adăugarea peștilor și în cursul fazelor de absorbție și de eliminare. Apa se eșantionează înainte de hrănire, concomitent cu eșantionarea peștilor. Pot fi utile eșantionări mai frecvente pentru a asigura stabilitatea concentrațiilor după introducerea peștelui. În timpul fazei de absorbție, se determină concentrațiile de substanță de testat pentru a verifica dacă acestea satisfac criteriile de validitate (punctul 24). În cazul în care analizele probelor de apă la începutul fazei de eliminare arată că substanța de testat nu este detectată, acest lucru poate fi utilizat ca o justificare pentru a nu se măsura apa de testare și martor pentru substanța de testat pentru perioada rămasă din faza de eliminare.

Peștii sunt eșantionați de cel puțin cinci ori în timpul fazei de absorbție și de cel puțin patru ori în cursul fazei de eliminare pentru substanța de testat. Având în vedere faptul că uneori este dificil de calculat o valoare estimativă rezonabil de precisă pentru BCF pe baza acestui număr de eșantioane (în special atunci când nu se indică o cinetică de ordin întâi de absorbție și eliminare), se recomandă prelevarea de eșantioane mai frecvent în ambele perioade (a se vedea appendicele 4)

Se stabilește conținutul lipidic utilizând același material biologic care a servit la determinarea concentrației substanței de testat, cel puțin la începutul și la sfârșitul fazei de absorbție și la finalul fazei de eliminare. În cazul în care acest lucru nu este posibil, se prelevează eșantioane de la cel puțin trei pești independenți pentru a se determina conținutul lipidic la fiecare dintre cele trei momente. Se adaptează în consecință numărul de pești pe bazin la începutul experimentului ⁽¹⁾. În mod alternativ, în cazul în care nu se detectează cantități semnificative de substanță de testat în peștii martor (și anume, peștii proveniți din populația de stoc), aceștia pot fi analizați numai pentru conținutul lipidic și analiza substanței de testat în grupul (grupurile) de testare (și constanta de viteză de absorbție, constanta de viteză de eliminare și valorilor BCF) poate fi corectată pentru modificări în funcție de conținutul lipidic din grupul martor în timpul testării ⁽²⁾.

Peștii morți sau bolnavi nu se analizează pentru substanța de testat sau concentrația lipidică.

În appendicele 4 se găsește un exemplu de calendar acceptabil de eșantionare. Alte calendare pot fi determinate cu ușurință, pe baza valorilor presupuse ale K_{ow} , pentru a calcula timpul de expunere corespunzător unei absorbții de 95 % (a se vedea appendicele 5 pentru calcule).

Se continuă eșantionarea în cursul fazei de absorbție, până la obținerea unei stări staționare (a se vedea appendicele 1, secțiunea definiții și unități) sau până la finalizarea fazei de absorbție (după 28 sau 60 de zile, a se vedea punctele 37 și 38). Înainte de începerea fazei de eliminare, peștii se transferă în vase curate.

Eșantionarea și pregătirea eșantioanelor

Se prelevează probe de apă pentru analize, de exemplu prin sifonare cu ajutorul unui tub inert, într-un punct central al camerei de testare. Nici procesul de filtrare și nici cel de centrifugare nu separă întotdeauna fracția nonbiodisponibilă de substanță de testat de cea biodisponibilă. În cazul în care se aplică o tehnică de separare, se furnizează întotdeauna o justificare sau o validare a acesteia în raportul de testare, având în vedere dificultățile de biodisponibilitate (25). În special în cazul substanțelor puternic hidrofobe (și anume, substanțele cu $\log K_{ow} > 5$) (12) (26), atunci când ar putea avea loc adsorbția pe matricea de filtrare sau recipientele de centrifugare, eșantioanele nu se supun la aceste tratamente. În schimb, se iau măsuri pentru ca rezervoarele să fie cât mai curate posibil (a se vedea punctul 46) și se monitorizează conținutul de carbon organic total pe parcursul fazelor de absorbție și de eliminare (a se vedea punctul 53). Pentru evitarea unor eventuale probleme de biodisponibilitate redusă, se poate utiliza prelevarea de eșantioane prin tehnici de microextracție în fază solidă în cazul substanțelor cu solubilitate scăzută și al celor puternic hidrofobe.

⁽¹⁾ În cazul în care conținutul lipidic nu este analizat în aceeași pești precum substanța de testat, peștele trebuie să fie cel puțin de greutate asemănătoare și (dacă este relevant) de același sex.

⁽²⁾ Această alternativă este valabilă numai în cazul în care peștii din toate grupurile testate sunt ținuti în grupuri de dimensiuni similare, sunt îndepărtați în conformitate cu același model și hrăniți în același mod. Acest lucru garantează o creștere similară în toate grupurile de testare, în cazul în care concentrația testată este inferioară plajei de valori toxice. În cazul în care creșterea este similară, de asemenea, se preconizează un conținut lipidic similar. O creștere diferită la martor ar indica un efect al substanței și ar invalida studiul.

Peștii prelevați se eutanasiază în mod instantaneu, într-o manieră cât mai umană posibil [pentru măsurători de pești întregi, nu sunt necesare alte procedee decât clătirea cu apă (a se vedea punctul 28) și uscarea peștelui cu hârtie absorbantă]. Se cântărește și se măsoară lungimea totală ⁽¹⁾. În fiecare pește, greutatea și lungimea măsurate trebuie să fie legate de concentrația de substanță analizată (și conținutul lipidic, dacă este cazul), de exemplu, utilizând un cod unic de identificare pentru fiecare pește eșantionat.

Este preferabil să se analizeze peștii și apa imediat după eșantionare, pentru a se evita orice degradare sau alte pierderi și pentru a calcula în mod aproximativ constantele de viteză de absorbție și de eliminare, în vreme ce testul continuă să se desfășoare. De asemenea, analiza imediată evită întârzierea determinării faptului dacă s-a atins un platou (stare staționară).

În lipsa unei analize imediate, eșantioanele se depozitează printr-o metodă corespunzătoare. Înainte de începerea studiului, se obțin informații cu privire la metodele de depozitare adecvate substanței de testat – de exemplu: congelare, menținere la 4 °C, extracție etc. Durata de depozitare se selectează astfel încât să se asigure că substanța nu s-a degradat în timpul depozitării.

Calitatea metodei analitice

Întrucât întreaga procedură este reglementată, în principal, de exactitatea, precizia și sensibilitatea metodei analitice utilizate pentru substanța de testat, se verifică în mod experimental ca acuratețea, precizia și reproductibilitatea analizei substanței, precum și recuperarea substanței de testat din apă și pește să fie satisfăcătoare pentru o anumită metodă. Aceasta ar trebui să facă parte din testele preliminare. De asemenea, se are în vedere ca substanța de testat să nu fie detectabilă în apa de diluție utilizată. În cazul în care este necesar, se corectează valorile de concentrație ale substanței de testat în apă și pește obținute în urma testului pentru a reflecta recuperările și valorile de bază furnizate de martori. Pe tot parcursul testării, eșantioanele de pești și de apă se manipulează astfel încât să se minimizeze contaminările și pierderile (de exemplu, rezultate în urma absorbției prin materialul de eșantionare).

Analiza eșantioanelor de pești

În cazul în care se utilizează materiale marcate radioactiv, se poate analiza marcajul radioactiv total (și anume, compușii de origine și metaboliții) sau eșantioanele pot fi purificate astfel încât compusul de origine să poată fi analizat în mod separat. În cazul în care BCF urmează să fie bazat pe substanța mamă, se caracterizează principalii metaboliți cel puțin la sfârșitul fazei de absorbție (a se vedea punctul 6). Metaboliți principali sunt cei care reprezintă $\geq 10\%$ din reziduurile totale în țesuturile peștilor, cei care reprezintă $\geq 5\%$ la două puncte de prelevare de probe consecutive, cei care manifestă niveluri de creștere pe durata fazei de absorbție și cei de interes toxicologic cunoscut. În cazul în care BCF pentru întreaga cantitate de pește în ceea ce privește reziduurile totale marcate radioactiv este ≥ 500 , poate fi indicat – și pentru anumite categorii de substanțe, cum ar fi pesticidele, se recomandă cu fermitate – identificarea și cuantificarea metaboliților principali. Cuantificarea acestor metaboliți poate fi solicitată de unele autorități de reglementare. În cazul în care se identifică și se cuantifică produsele de degradare reprezentând $\geq 10\%$ din reziduuri totale marcate radioactiv în țesuturile peștilor, este recomandat ca acestea să fie identificate și cuantificate, de asemenea, în apa pentru experiment. În cazul în care acest lucru nu este fezabil, se furnizează explicații în cadrul raportului.

În general, concentrația substanței de testat trebuie să fie determinată pentru fiecare pește cântărit. În cazul în care acest lucru nu este posibil, se pot pune în comun eșantioanele la fiecare testare, însă această metodă limitează procedurile statistice care pot fi aplicate datelor, astfel încât ar trebui să se includă în cadrul testului un număr adecvat de pești pentru a face posibilă punerea în comun, procedura și precizia statistică. Referințele (27) și (28) pot fi utilizate ca o introducere la procedurile de punere în comun relevante.

⁽¹⁾ În plus față de greutate, se înregistrează lungimea totală, deoarece compararea gradului de creștere de lungime în timpul testului este un bun indicator pentru a stabili dacă s-a produs un efect advers.

BCF-ul va fi exprimat ca normalizat la o specie de pește cu un conținut de lipide de 5 % (pe baza greutateii umede), în plus față de cel obținut în mod direct din studiu (a se vedea punctul 21), cu excepția cazului în care se poate argumenta faptul că substanța de testat nu se acumulează în special în lipide. Conținutul lipidic al peștilor se determină la fiecare prelevare de probe, dacă este posibil, preferabil pe același extract ca pentru analiza substanței de testat, întrucât adesea lipidele trebuie scoase din extract înainte de a putea fi analizate prin cromatografie. Cu toate acestea, analiza substanțelor de testat necesită adesea proceduri de extracție specifice care ar putea fi în contradicție cu metodele de testare pentru determinarea lipidelor. În acest caz (până când sunt disponibile metode instrumentale nedistructive adecvate), se recomandă utilizarea altei strategii pentru determinarea conținutului lipidic al peștilor (a se vedea punctul 56). Se utilizează metode adecvate pentru determinarea conținutului lipidic (20). Tehnici de extracție prin cloroform/metanol (29) pot fi recomandate ca metode standard (30), dar metoda Smedes (31) este recomandată ca o tehnică alternativă. Această ultimă metodă este caracterizată de o eficiență de extracție comparabilă, un nivel ridicat de acuratețe, utilizarea de solvenți organici mai puțin toxici, precum și ușurința realizării. Se pot utiliza alte metode a căror precizie poate fi comparată în mod favorabil cu metodele recomandate, în cazul în care acestea sunt justificate în mod corespunzător. Este important să se precizeze detaliile metodei utilizate.

Măsurarea creșterii peștilor

La începutul testului, cinci până la zece pești proveniți dintr-o populație stoc se cântăresc în mod individual și se măsoară lungimea totală a acestora. Se pot utiliza aceiași pești ca pentru analiza conținutului lipidic (a se vedea punctul 56). Se măsoară greutatea și lungimea peștilor utilizați pentru fiecare eșantionare din grupul de testare și grupul martor înainte de efectuarea analizei chimice sau a lipidelor. Măsurătorile peștilor incluși în eșantionare pot fi utilizate pentru a estima greutatea și lungimea peștilor rămași în bazinele de testare și martor (a se vedea punctul 45).

DATE ȘI RAPORTARE

Prelucrarea rezultatelor

Se obține curba de absorbție a substanței de testat din traseul concentrației sale în funcție de timp, la/în pești (sau în țesuturile specifice), în perioada fazei de absorbție, utilizând o scară aritmetică. În cazul în care curba atinge un platou, și anume aceasta adoptă aproximativ un traseu asimptotic la axa timpului, se va calcula starea staționară BCF (BCF_{ss}) după cum urmează:

$$\frac{C_f \text{ la starea staționară (media)}}{C_w \text{ la starea staționară (media)}}$$

Dezvoltarea C_p poate fi influențată de creșterea peștelui (a se vedea punctele 72 și 73). Concentrația de expunere medie (C_a) este influențată de variația în timp. Se poate estima faptul că o concentrație medie ponderată este mai relevantă și mai precisă pentru studiile de bioacumulare, inclusiv în cazul în care variația se încadrează în plaja de valori de valabilitate corespunzătoare (a se vedea punctul 24). Se poate calcula o medie ponderată de timp (MPT) a concentrației de apă în conformitate cu apendicele 5, secțiunea 1.

Se determină factorul de bioconcentrare cinetică (BCF_k) ca raportul k_1/k_2 , cele două constante cinetice de ordinul întâi. Se obțin constantele de viteză k_1 și k_2 și BCF_k prin montarea simultană atât a fazei de absorbție, cât și a fazei de eliminare. În mod alternativ, k_1 și k_2 se pot determina secvențial (a se vedea apendicele 5 pentru descrierea și compararea acestor metode). Constanta de viteză de eliminare (k_2) ar putea necesita ajustare pentru diluția de creștere (a se vedea punctele 72 și 73). În cazul în care curba de absorbție și/sau de eliminare nu este în mod clar de ordinul întâi, se utilizează modele mai complexe (a se vedea referințele din apendicele 5) și se solicită consiliere din partea unui biostatistician și/sau a unui specialist în farmacocinetică.

Date cu privire la greutatea/lungimea peștelui

Se prezintă sub formă de tabel greutatea umedă individuală ale peștilor pentru toate intervalele de eșantionare pentru grupurile de testare și martor în timpul fazelor de absorbție (inclusiv populația de pești la începutul absorbției) și de eliminare. La fiecare pește, greutatea și lungimea măsurate trebuie să fie asociate concentrației chimice analizate, de exemplu utilizând un cod unic de identificare pentru fiecare pește eșantionat. Greutatea este măsura preferată de creștere pentru a corecta valorile BCF cinetică pentru diluția de creștere (a se vedea punctul 73 și apendicele 5 pentru metoda utilizată pentru a determina corectarea datelor pentru diluția de creștere).

Corectarea diluției de creștere și normalizarea conținutului lipidic

Creșterea peștelui în timpul fazei de eliminare poate conduce la o scădere a concentrației chimice măsurată în pești, având ca efect faptul că constanta de viteză de eliminare generală (k_2) este mai mare decât cea care ar rezulta numai în urma proceselor de îndepărtare (de exemplu, respirație, metabolism, egestie). Factorii de bioconcentrare cinetică se corectează pentru a ține cont de diluția de creștere. Un BCF_{ss} va fi influențat de creștere, de asemenea, dar nu este disponibilă o procedură convenită pentru corectarea unui BCF_{ss} pentru creștere. În caz unei creșteri semnificative, se obține, de asemenea, BCF_k corectat pentru creștere ($BCF_{k,c}$), deoarece acesta poate fi o măsură mai relevantă a factorului de bioconcentrare. Conținuturile lipidice ale peștilor de testat (care sunt strâns legate de bioacumularea substanțelor hidrofobe) pot varia suficient în practică astfel încât să fie necesară normalizarea la un ansamblu de pește a conținutului de lipide (5 % g/g) pentru a prezenta atât factorii de bioconcentrare cinetică, cât și cei de în stare staționară în mod semnificativ, cu excepția cazului în care se poate argumenta faptul că substanța de testat nu se acumulează în principal în lipide (de exemplu, unele substanțe perfluorinate se pot lega de proteine). În apendicele 5 sunt disponibile ecuații și exemple pentru aceste calcule.

Pentru a corecta un BCF cinetic pentru creștere de diluție, se corectează constanta de viteză de eliminare pentru creștere. Această constantă de viteză de eliminare corectată pentru creștere (k_{2c}) se calculează scăzând constanta de viteză de creștere (k_c , astfel cum a fost obținută din datele privind greutatea măsurată) din constanta de viteză de eliminare totală (k_2). Se calculează ulterior factorul de bioconcentrare cinetică corectat pentru creștere prin împărțirea constantei de viteză de absorbție (k_1) la constanta de viteză de eliminare corectată pentru creștere (k_{2c}) (a se vedea apendicele 5). În unele cazuri, această abordare este compromisă. De exemplu, pentru substanțele cu rată de eliminare foarte scăzută testate în pești cu creștere rapidă, k_{2c} derivată poate fi foarte mică și, prin urmare, eroarea în calcularea constantelor de viteză utilizate la derivarea acesteia devine critică și, în unele cazuri, estimările k_c pot fi mai mari decât estimările k_2 . O abordare alternativă care eludează necesitatea corecției de diluție implică utilizarea datelor de eliminare cu privire la masa de substanță de testat pe pește (pește întreg) în locul datelor cu privire la masa obișnuită de substanță de testat pe unitate de masă de pește (concentrație). Acest lucru poate fi realizat cu ușurință având în vedere faptul că testele în conformitate cu prezenta metodă de testare asociază concentrațiile de țesuturi înregistrate cu greutatea corporale individuale ale peștilor. În apendicele 5 se prezintă procedura simplă pentru efectuarea acestui lucru. Se remarcă faptul că k_2 se raportează în continuare, inclusiv dacă se utilizează această abordare alternativă.

Factorii de bioconcentrare cinetică și în stare staționară se raportează, de asemenea, în raport cu conținutul lipidic implicit al peștilor de 5 % (g/g), cu excepția cazului în care se poate argumenta faptul că substanța de testat nu se acumulează în principal în lipide. Datele privind concentrația de pește sau BCF sunt normalizate, în conformitate cu raportul dintre 5 % și media reală (individuală) a conținutului lipidic (în % de greutate umedă) (a se vedea apendicele 5).

În cazul în care au fost efectuate analizele chimice și lipidice pe aceiași pești, se utilizează ulterior datele normalizate privind conținutul lipidic al fiecărui pește pentru a calcula un BCF normalizat de lipide. În mod alternativ, în cazul în care creșterea este similară la peștii martor și la cei expuși, se poate utiliza conținutul lipidic al peștilor martori singuri pentru corectarea lipidelor (a se vedea punctul 56). În apendicele 5 se prezintă o metodă de calculare a BCF normalizat de lipide.

Interpretarea rezultatelor

Rezultatele se vor interpreta cu precauție atunci când concentrațiile măsurate de soluție experimentală se află la valori apropiate de limita de detecție a metodei de analiză.

Creșterea medie în grupurile de testare și martor, în principiu, nu trebuie să fie diferită în mod semnificativ, pentru a exclude efecte toxice. Se compară constantele de viteză de creștere sau curbele de creștere a celor două grupuri printr-o procedură adecvată ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Se poate efectua un test t asupra constantelor de viteză de creștere pentru a verifica dacă creșterea diferă între grupurile de testare și martor sau un test F în cazul analizei de varianță. În cazul în care este necesar, un test F sau un test al raportului de probabilitate poate fi utilizat pentru a contribui la alegerea modelului de creștere adecvat [monografia 54, OCDE (32)].

Claritatea cu care sunt definite curbele de absorbție și de eliminare dovedește buna calitate a datelor de bioconcentrare. În cazul constantelor de viteză, rezultatul unui test de calitate a ajustării χ^2 dovedește o ajustare de calitate [și anume, procent de eroare de mică măsură (32)] pentru modelul de bioacumulare, astfel încât constantele de viteză pot fi considerate fiabile (a se vedea appendicele 5). În cazul în care se utilizează mai mult de o concentrație de testare, variația constantelor de absorbție/eliminare între cele două concentrații de testare trebuie să fie mai mică de 20 % ⁽¹⁾. În caz contrar, se poate indica dependența de concentrație. Se înregistrează diferențele considerabile observate la constantele de viteză de absorbție/eliminare între concentrațiile de testare aplicate și se furnizează posibile explicații. În general, limita de încredere de 95 % a BCF din studiile bine concepute se apropie de ± 20 %.

În cazul în care se testează două sau mai multe concentrații, se utilizează rezultatele ambelor sau tuturor concentrațiilor pentru a verifica dacă rezultatele sunt coerente și pentru a determina dacă există o dependență de concentrație. În cazul în care se testează o singură concentrație pentru a reduce utilizarea animalelor și/sau a resurselor, se furnizează justificarea utilizării unei singure concentrații.

BCF_{ss} rezultat este îndoielnic în cazul în care BCF_k este mult mai mare decât BCF_{ss}, având în vedere faptul că acest lucru poate fi un indiciu că nu s-a ajuns la starea staționară sau că nu s-a luat în considerare diluția de creștere sau procesele de pierdere. În cazurile în care BCF_{ss} este mult mai mare decât BCF_k, se verifică de erori derivarea constantelor de viteză de absorbție și de eliminare și se reevaluează. O altă procedură de montare ar putea îmbunătăți estimarea BCF_k (a se vedea appendicele 5).

Raport de testare

În afară de informațiile privind substanța de testat indicate la punctul 3, raportul de testare include următoarele informații:

Substanța de testat:

Natura fizică și, dacă sunt relevante, proprietățile fizico-chimice;

- Datele de identificare chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților, după cum este adecvat și fezabil din punct de vedere practic etc., (inclusiv conținutul de carbon organic, dacă este necesar).
- Pentru substanțele multicomponente și UVCB (substanțele chimice cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice) descrierea, în măsura în care este posibil, a identității chimice a fiecărui compus și, pentru fiecare dintre aceștia, procentul său din masa totală a substanței. Se rezumă modalitatea prin care metoda analitică utilizată în test reflectă o măsură a concentrației substanței; se descriu toate procedurile analitice, inclusiv precizia metodei, limita de detectare a metodei și limita de cuantificare.
- În cazul marcării radioactive, poziția precisă a atomului (atomilor) marcat (marcați) și procentajul de radioactivitate asociată impurităților.
- Informații referitoare la toxicitatea substanței de testare pentru pești (în mod ideal, speciile testate). Toxicitatea se raportează ca o CL₅₀ acută de 96 de ore și NOAEC & LOAEC dintr-un studiu de toxicitate cronică (și anume, un test în primele etape ale vieții sau un test pe ciclul de viață complet, dacă este disponibil).
- Condițiile de depozitare pentru substanța chimică de testat sau substanța de testat și stabilitatea substanței chimice de testat sau substanța de testat în condițiile de depozitare în cazul în care sunt depozitate înainte de utilizare.

Speciile de testare:

Denumire științifică, sușă, sursă, orice tratament prealabil, aclimatizare, vârstă (dacă este relevant), intervalul de dimensiuni (greutate și lungime), etc.

⁽¹⁾ Aceste procentaje presupun că metodele analitice sunt fiabile, iar timpul de înjumătățire este < 14 zile. În cazul în care metodele de analiză sunt mai puțin fiabile sau timpul de înjumătățire este mărit (considerabil), aceste numere, de asemenea, vor deveni mai mari.

Condiții de testare:

- Procedura de testare utilizată (de exemplu, reînnoire continuă sau semistatică); studiu normal sau concept minimizat (inclusiv motivația și justificarea).
- Tipul și caracteristicile iluminării utilizate și fotoperioada (fotoperioadele).
- Modelul de testare (de exemplu, numărul și dimensiunea camerelor de testare, regimul de înlocuire al volumelor de apă, regimul de încărcare, numărul de replici, numărul de pești pe replică, număr de concentrații de testare, durata fazelor de absorbție și de epurare, frecvența eșantionării pentru pești și pentru apă);
- Metoda de preparare a soluțiilor mamă și frecvența de reînnoire (solventul, concentrația acestuia și contribuția acestuia la conținutul în carbon organic al apei pentru testare se menționează, dacă este cazul) sau o descriere a sistemului alternativ de dozare.
- Concentrațiile de testare nominale, mediile valorilor măsurate și deviația standard a acestora în vasele de testare, precum și metoda și frecvența de obținere a acestora;
- Sursa de apă de diluție, descrierea tuturor tratamentelor prealabile, rezultatele tuturor demonstrațiilor de aptitudine a peștilor de supraviețuire în această apă și caracteristicile apei: pH, duritate, temperatură, concentrația de oxigen dizolvat, nivelul clorului rezidual (dacă este măsurat), carbonul organic total, solide în suspensie, salinitatea mediului experimental (dacă este cazul) și orice alte măsurători efectuate.
- Calitatea apei în vasele de testare, pH, duritate, COT, temperatura și concentrația de oxigen dizolvat; metodele utilizate și frecvența măsurărilor.
- Informații detaliate legate de alimentație, de exemplu, tipul (tipurile) de hrană, sursă, compoziție (cel puțin conținutul lipidic și de proteine, dacă este posibil), regimul de alimentare selectat, cantitatea furnizată și frecvența;
- Informații legate de tratamentul peștilor și al apei eșantionate, inclusiv detalii de preparare, depozitare, extracție, proceduri (și precizia) de analiză a substanței de testat și conținutul lipidic.
- Metodele utilizate pentru randomizarea tratamentului și alocarea peștilor în vasele de testare.
- Data privind introducerea organismelor de testare în soluțiile de testare și durata testului.
- Descrierea testelor de stabilire a intervalului și rezultatele, dacă acestea sunt disponibile.

Rezultate:

- Rezultatele studiilor preliminare efectuate.
- Mortalitatea peștilor martor și a peștilor din fiecare cameră de testare, precum și orice comportament anormal observat.
- Informații cu privire la orice efecte adverse observate.
- Descrierea completă a tuturor procedurilor de analiză chimice utilizate, inclusiv limitele de detecție și cuantificare, variabilitatea și recuperarea.
- Conținutul lipidic al peștilor, inclusiv metoda utilizată și, dacă este derivat, factorul normalizare de lipide (L_n , factor de exprimare a rezultatelor în raport cu conținutul lipidic al peștilor de 5 %).
- Date privind greutatea peștelui (și lungimea) prezentate sub formă de tabel, legate de concentrațiile chimice individuale ale peștilor (și conținutul lipidic, dacă este cazul), atât pentru grupul martor, cât și pentru cel de testare (de exemplu, prin utilizarea unor identificatori unici pentru fiecare pește eșantionat) și calculele privind constanta (constantele) de creștere derivată (derivate).
- Date cu privire la concentrația substanței de testat în pește (C_p , legată de indivizi) și în apă (C_a), prezentate sub formă de tabel (cu valori medii pentru grupul de testare și martor, deviația standard și intervalul, dacă este cazul) la momentul fiecărei eșantionări (C_p se exprimă în mg/kg de greutate umedă din întreg peștele sau din anumite țesuturi, de exemplu, lipidele și C_a se exprimă în mg/l). Valorile C_a pentru seria martor (se raportează, de asemenea, concentrația de bază).

- Curbele (inclusiv toate măsurătorile efectuate), evidențiind următoarele elemente (dacă este cazul, concentrațiile pot fi exprimate în raport cu întregul corp și cu conținutul lipidic normalizat la 5 % din animale sau din țesuturile specifice ale acestora):
 - creșterea, și anume, greutate peștelui în timp sau logaritm natural de greutate transformată în funcție de timp (inclusiv constanta de viteză de creștere derivată, k_c);
 - absorbția și eliminarea substanței de testat în pește (pe un grafic);
 - timpul până la starea staționară (dacă se atinge);
 - logaritm natural de concentrație transformată în funcție de timpul de absorbție (inclusiv constanta de viteză de absorbție k_1 derivată);
 - logaritm natural de concentrație transformată (ln concentrație) în funcție de timpul de eliminare (inclusiv constanta de viteză de eliminare k_2 derivată); și
 - curbele fazelor de absorbție și de eliminare, prezentând atât datele, cât și modelul.
- În cazul în care o inspecție vizuală a reprezentării grafice demonstrează aberante extreme, se poate aplica un test de detectare a valorilor aberante valid din punct de vedere statistic pentru a elimina punctele de date false, precum și o justificare documentată pentru omiterea acestora.
- Factorul de bioconcentrare în stare staționară (BCF_{ss}), în cazul în care starea staționară este (aproape) atinsă.
- Factor de bioconcentrare cinetică (BCF_k) și constantele de viteză de absorbție și de eliminare (k_1 și k_2 , împreună cu varianțele în k_2 (pantă și ordonata la origine) în cazul în care se utilizează montarea secvențială.
- Limite de încredere, deviația standard (după caz) și metode de calcul/analiză de date pentru fiecare parametru pentru fiecare concentrație de substanță de testat utilizată.
 - Orice informații privind metabolismul substanței de testat marcați radioactiv și acumularea acestora.
 - Constanta (constantele) vitezei de creștere [inclusiv intervalul (intervalele) de încredere de 95 %] și constanta vitezei de eliminare corectată în funcție de creștere (k_{2c}), timpii de înjumătățire și valorile BCF (BCF_{kc}).
 - Toate situațiile neobișnuite legate de test, orice deviație de la aceste proceduri și orice alte informații relevante.
- Un tabel recapitulativ al datelor relevante măsurate și calculate, după cum urmează:

Constantele de viteză de absorbție și de eliminare și factorii de bioconcentrare (BCF) ai substanței	
k_c (constantă de viteză de creștere; $ziua^{-1}$):	A se introduce valoarea (95 % CI) ⁽¹⁾
k_1 (constantă de viteză de absorbție totală; $l\ kg^{-1}\ ziua^{-1}$):	A se introduce valoarea (95 % CI) ⁽¹⁾
k_2 (constantă de viteză de eliminare totală; $ziua^{-1}$):	A se introduce valoarea (95 % CI) ⁽¹⁾
k_{2c} (constantă de viteză de eliminare corectată de creștere; $ziua^{-1}$):	A se introduce valoarea (95 % CI) ⁽¹⁾
C_p (concentrația chimică în pește la starea staționară; $mg\ kg^{-1}$):	A se introduce valoarea $\pm DS$ ⁽²⁾
C_a (concentrația chimică în apă; $mg\ l^{-1}$):	A se introduce valoarea $\pm DS$ ⁽²⁾
L_n (factor de normalizare lipidică):	A se introduce valoarea ⁽³⁾

Constantele de viteză de absorbție și de eliminare și factorii de bioconcentrare (BCF) ai substanței	
BCF _{ss} (BCF la starea staționară; l kg ⁻¹)	A se introduce valoarea ± DS ⁽²⁾
BCF _{SSL} (BCF la starea staționară normalizat lipidic; l kg ⁻¹):	A se introduce valoarea ⁽³⁾ ± SD ⁽²⁾
BCF _k (BCF cinetică; l kg ⁻¹)	A se introduce valoarea (95 % CI) ⁽¹⁾
BCF _{kc} (BCF cinetică corectat de creștere; l kg ⁻¹)	A se introduce valoarea (95 % CI) ⁽¹⁾
t _{1/2g} (timpii de înjumătățire corecți de creștere; ziua):	A se introduce valoarea (95 % CI) ⁽¹⁾
BCF _{KL} (BCF cinetică normalizat lipidic; l kg ⁻¹):	A se introduce valoarea
BCF _{KLc} (BCF cinetică normalizat lipidic corectat de creștere; l kg ⁻¹):	A se introduce valoarea
⁽¹⁾ CI: intervalul de încredere (dacă se poate estima)	
⁽²⁾ DS: Deviația standard (dacă se poate estima)	

Se evită rezultatele raportate ca „nedetectat/cuantificat la limita de detecție/cuantificare”, prin utilizarea unei metode experimentale preliminare și elaborarea unui model experimental, deoarece astfel de rezultate nu pot fi utilizate pentru calculul constantelor de viteză.

C.13 – II: Test minimizat de expunere prin apă a peștilor

INTRODUCERE

Experiența de creștere dobândită în efectuarea și interpretarea testului complet, atât de către laboratoare, cât și de organisme de reglementare, arată că – cu unele excepții – cinetica de ordin întâi se aplică pentru estimarea constantelor de viteză de absorbție și de eliminare. Prin urmare, constantele de viteză de absorbție și de eliminare pot fi estimate cu un număr minim de puncte de eșantionare și BCF cinetică derivat.

Scopul inițial al examinării de modele alternative pentru studiile BCF a fost elaborarea unui test minimizat pentru a fi utilizat într-o etapă de testare intermediară pentru a infirma sau a confirma estimările BCF bazate pe K_{OW} și QSAR și, astfel, să se elimine necesitatea unui studiu complet pentru numeroase substanțe și să se reducă la minim costurile și utilizarea animalelor prin reducerea eșantioanelor și a numărului de secvențe analitice efectuate. Urmărind modelul principal al metodei de testare anterioare pentru a permite integrarea rezultatelor testului în datele existente privind BCF și pentru a facilita efectuarea testelor și interpretarea datelor, obiectivul a fost de a furniza estimări BCF cu o precizie și exactitate adecvate pentru decizii în materie de evaluare a riscurilor. Multe dintre aceleași considerente se aplică la fel ca în testul complet, de exemplu, criteriile de validitate (a se vedea punctul 24) și încheierea unui test în cazul în care se observă absorbție nesemnificativă la finalul fazei de absorbție (a se vedea punctele 16 și 38).

Substanțele care ar fi eligibile pentru modelul testului minimizat aparțin domeniului general pentru care a fost elaborată această metodă de testare și anume, substanțe organice nepolare (a se vedea punctul 49). În cazul în care există orice fel de indiciu că substanța care urmează să fie testată ar putea manifesta un comportament diferit (de exemplu, o abatere clară de la cinetica de ordinul întâi), se efectuează un test complet în scopuri de reglementare.

În general, testul minimizat nu se efectuează pe o perioadă mai scurtă decât testul BCF standard, ci constă în mai puține eșantionări ale peștilor (a se vedea appendicele 6 pentru justificare). Cu toate acestea, perioada de eliminare poate fi redusă în cazul substanțelor cu eliminare rapidă pentru a se evita încadrarea concentrațiilor din pește sub limita de detecție/cuantificare înainte de sfârșitul testului. Un test cu expunere minimizată a peștilor cu o singură concentrație poate fi utilizat pentru a se determina necesitatea unui test complet și, în cazul în care datele utilizate pentru calcularea constantelor de viteză și BCF sunt solide (a se vedea punctul 93), se poate elimina testul complet dacă BCF rezultat este departe de valorile normative de interes.

În unele cazuri, poate fi avantajoasă efectuarea modelului de testare minimizat cu mai mult de o concentrație de testare, ca test preliminar pentru a stabili dacă estimările BCF pentru o substanță sunt dependente de concentrație. În cazul în care estimările BCF din testul minimizat arată o dependență de concentrație, este necesară efectuarea unui test complet. În cazul în care, pe baza unui astfel de test minimizat, estimările BCF nu sunt dependente de concentrație, dar rezultatele nu sunt considerate definitive, atunci orice testare completă ulterioară se poate efectua la o singură concentrație, reducând, prin urmare, utilizarea animalelor în comparație cu un test complet cu două (sau mai multe) concentrații.

Substanțele potențial eligibile pentru testul minimizat trebuie:

- Să fie susceptibile să prezinte cinetici de absorbție și eliminare aproximativ de ordinul întâi, de exemplu rezultate din extrapolarea cu substanțe similare;
- Să aibă o valoare $\log K_{ow} < 6$, cu excepția cazului în care se preconizează un metabolism rapid ⁽¹⁾;
- Să fie suficient de solubile în apă în ceea ce privește tehnica analitică (a se vedea punctul 24);
- Să fie clar cuantificabile (și anume, concentrațiile trebuie să fie de cel puțin un ordin de mărime mai mare decât limita de cuantificare) atât în pești, cât și în apă, se recomandă marcarea radioactivă (a se vedea punctul 23);
- Să aibă o perioadă de eliminare mai mare decât timpul de înjumătățire preconizat (a se vedea appendicele 5 pentru calcule) sau perioada de eliminare se ajustează în consecință (a se vedea punctul 91). Este permisă o excepție de la această regulă în cazul în care se preconizează un metabolism rapid al substanței.

CALENDAR DE EȘANTIONARE PENTRU STUDIILE CARE URMEAZĂ MODELUL MINIMIZAT

Eșantionarea peștilor

Eșantionarea peștilor este redusă la patru puncte de prelevare:

- La mijlocul și la sfârșitul fazei de absorbție (acestea din urmă fiind, de asemenea, începutul eliminării) de exemplu, după 14 și 28 de zile (33).
- La mijlocul fazei de eliminare și la încheierea studiului (când concentrația substanței este $< 10\%$ din concentrația maximă sau, cel puțin, când se depășește în mod clar un timp de înjumătățire al substanței), de exemplu, după 7 și 14 zile de eliminare (33). În cazul în care se preconizează sau se observă eliminarea rapidă, poate fi necesar să se scurteze perioada de eliminare pentru a se evita concentrații în pește sub limita de cuantificare.
- La măsurarea lipidică, precum în studiul complet.
- La corectarea în funcție de creștere, precum în studiul complet.
- BCF este calculat ca un BCF cinetică.

Eșantionarea probelor de apă

Pentru modelul minimizat, apa va fi prelevată la fel ca în studiul complet (a se vedea punctul 54) sau de cel puțin cinci ori, programate în mod egal pe parcursul fazei de absorbție și săptămânal în faza de eliminare.

⁽¹⁾ Testul minimizat poate fi utilizat, de fapt, pentru a demonstra un metabolism rapid atunci când un astfel de metabolism este preconizat.

Modificări ale modelului

Ținând cont de proprietățile substanței de testat, de estimările valabile QSAR și de scopul specific al studiului, se pot lua în considerare anumite modificări în modelul studiului:

- În cazul în care este necesară o mai mare precizie, se pot utiliza mai mulți pești (6 sau 8 în loc de 4) pentru proba la finalul fazei de absorbție.
- Includerea unui grup „extra” de pești care urmează a fi utilizat în cazul în care eliminarea la 14 zile (sau sfârșitul preconizat al fazei de eliminare) nu a fost suficientă pentru o eliminare adecvată (și anume, > 50 %). În cazul în care durata estimată a fazei de eliminare este mai scurtă sau mai lungă de 14 zile, se adaptează calendarul de eșantionare (și anume, un grup de pește la sfârșitul estimat al fazei de eliminare și un grup după jumătate din acel timp).
- Utilizarea a două concentrații de testare pentru a examina posibila dependență de concentrație. În cazul în care rezultatele testului minimizat, efectuat cu două concentrații de testare, arată că BCF nu este dependent de concentrație (și anume, diferă sub 20 %), o concentrație de testare poate fi considerată suficientă în cadrul unui test complet, în cazul în care se desfășoară unul.
- Se pare că modele de procese de bioacumulare precum cele propuse de Arnot *et al.* (35) pot fi utilizate pentru a contribui la planificarea duratei fazelor de absorbție și de eliminare (a se vedea, de asemenea, apendicele 5).

Calcul

Justificarea acestei abordări constă în faptul că factorul de bioconcentrare într-un test complet poate fi determinat ca un factor de bioconcentrare în stare staționară (BCF_{ss}) prin calcularea raportului între concentrația substanței de testat în țesutul peștelui și concentrația substanței de testat în apă sau prin calcularea factorului de bioconcentrare cinetică (BCF_k) ca fiind raportul dintre constanta de viteză de absorbție k_1 și constanta de viteză de eliminare k_2 . BCF_k este valabil chiar dacă nu se atinge o concentrație în stare staționară a substanței în timpul absorbției, cu condiția ca absorbția și eliminarea să acționeze aproximativ în conformitate cu procesele cinetice de ordinul întâi. Ca minim absolut, sunt necesare două puncte de date pentru estimarea constantelor de viteză de absorbție și de eliminare, unul la sfârșitul fazei de absorbție (și anume, la începutul fazei de eliminare) și unul la sfârșitul (sau după o parte semnificativă a) fazei de eliminare. Punctul de eșantionare intermediar se recomandă ca un control privind cineticele de absorbție și de eliminare ⁽¹⁾. Pentru calcule, a se vedea apendicele 5 și 6.

Interpretarea rezultatelor

Pentru a evalua validitatea și valoarea informativă a testului, se verifică dacă perioada de eliminare depășește un timp de înjumătățire. De asemenea, BCF_{km} (BCF cinetică derivat dintr-o test minimizat) se compară cu valoarea BCF_{ss} minimizat (care este BCF_{ss} calculat la sfârșitul fazei de absorbție, presupunând că starea staționară a fost atinsă. Acest lucru poate fi doar presupus, având în vedere faptul că numărul de puncte de prelevare nu este suficient pentru a dovedi acest lucru). În cazul în care $BCF_{km} < BCF_{ss}$ minimizat, se preferă valoarea BCF_{ss} minimizat. În cazul în care BCF_{km} este mai mic de 70 % din valoarea BCF_{ss} minimizat, rezultatele nu sunt valabile și se efectuează un test complet.

În cazul în care testul minimizat furnizează un BCF_{km} din regiunea oricărei valori de interes de reglementare, se efectuează un test complet. În cazul în care rezultatul este departe de orice valoare care prezintă interes de reglementare (mult mai ridicat sau scăzut), este posibil ca un test complet să nu fie necesar sau se poate efectua un test complet cu o singură concentrație, dacă acest lucru este impus de cadrul de reglementare relevant.

În cazul în care un test complet se dovedește a fi necesar în urma unui test minimizat cu o singură concentrație, acesta poate fi efectuat la o a doua concentrație. În cazul în care rezultatele sunt coerente, se poate renunța la un test complet suplimentar la o concentrație diferită, având în vedere faptul că nu se preconizează ca bioconcentrarea substanței să fie dependentă de concentrație. În cazul în care testul minimizat a fost efectuat la două concentrații și rezultatele nu arată nicio dependență de concentrație, testul complet poate fi efectuat doar la o singură concentrație (a se vedea punctul 87).

⁽¹⁾ În cazul în care se măsoară doar două puncte de date, estimările pentru limitele de încredere pentru BCF_{km} pot fi efectuate utilizând metode „bootstrap”. În cazul în care sunt disponibile, de asemenea, punctele de date intermediare, limitele de încredere pentru BCF_{km} pot fi calculate precum în testul complet.

Raport de testare

Raportul de testare pentru testul minimizat trebuie să includă toate informațiile solicitate pentru testul complet (a se vedea punctul 81), cu excepția celor care sunt imposibil de elaborat (și anume, o curbă reprezentându-se timpul până la starea staționară și factorul de bioconcentrare în stare staționară; pentru cel din urmă se furnizează, în schimb, BCF_{ss} minimizat). În plus, acesta trebuie să includă, de asemenea, raționamentul pentru utilizarea testului minimizat și BCF_{km} rezultat.

C.13 – III Testul de bioacumulare în pești prin expunere alimentară

INTRODUCERE

Metoda descrisă în această secțiune se utilizează pentru substanțele în cazul cărora metodologia expunerii prin apă nu este posibilă (de exemplu, din cauza faptului că nu se pot menține concentrații de apă stabile, măsurabile, sau nu pot fi atinse conținuturi corporale adecvate în termen de 60 de zile de expunere; a se vedea secțiunile anterioare privind metoda de expunere prin apă). Trebuie menționat, cu toate acestea, faptul că pentru acest test criteriul final va fi un factor de bioamplificare prin alimentație (BMF) mai degrabă decât un factor de bioconcentrare (BCF) ⁽¹⁾.

În mai 2001, o nouă metodă pentru testarea bioacumulării substanțelor organice greu solubile în apă a fost prezentată în cadrul conferinței Europa SETAC, care a avut loc la Madrid (36). Această activitate a fost elaborată pornind de la diverse studii de bioacumulare raportate în referințele bibliografice utilizând o metodă de dozare cu hrană îmbogățită [de exemplu, (37)]. În prima parte a anului 2004, un proiect de protocol (38), conceput pentru a evalua potențialul de bioacumulare al substanțelor organice puțin solubile în apă, pentru care metoda de biocentrare cu expunere prin apă nu era posibilă, împreună cu un document de fundamentare de referință (39) a fost înaintat unui grup de lucru PBT al UE. Alte justificări furnizate pentru această metodă au fost faptul că potențiala expunere a mediului la substanțe cu solubilitate atât de scăzută (și anume, $\log K_{ow} > 5$) se poate efectua prin alimentație [a se vedea (40) (41) (42) (43) (44)]. Din acest motiv, teste cu expunerea prin alimentație sunt menționate în unele dintre regulamentele publicate privind substanțele chimice ⁽²⁾. Cu toate acestea, se menționează faptul că în metoda descrisă în prezenta anexă se evită cu prudență expunerea prin faza apoasă și, prin urmare, o valoare BMF din această metodă de testare nu poate fi comparată în mod direct cu o valoare BMF din cadrul unui studiu de teren (în care atât expunerea prin apă, cât și cea prin alimentație pot fi combinate).

Această secțiune din prezenta metodă de testare se bazează pe protocolul menționat (38) și este o metodă nouă care nu figurează în versiunea anterioară a MT C.13. Acest test alternativ permite investigarea în mod direct a căii de expunere prin alimentație în condiții controlate de laborator.

Potențialii investigatori trebuie să se refere la punctele 1-14 din această metodă pentru informații privind cazurile în care testul cu expunere prin alimentație poate fi preferat în locul testului cu expunere prin apă. Informațiile despre diferite considerații privind substanța sunt stabilite și se iau în considerare înainte de efectuarea unui test.

Utilizarea substanțelor de testat marcate radioactiv poate fi luată în considerare utilizând considerații similare celor pentru metoda expunerii prin apă (a se vedea punctele 6 și 65).

Metoda prin alimentație poate fi utilizată pentru a testa mai multe substanțe în cadrul unui singur test, atât timp cât sunt îndeplinite anumite criterii; acestea sunt examinate suplimentar la punctul 112. Pentru simplificare, prezenta metodologie descrie un test care utilizează o singură substanță de testat.

Testul prin alimentație este similar cu metoda expunerii prin apă din multe puncte de vedere, cu excepția căii de expunere. Prin urmare, multe aspecte ale metodei descrise aici se suprapun cu metoda expunerii prin apă descrisă în secțiunea anterioară. Trimiteri la punctele relevante din secțiunea anterioară au fost efectuate pe cât posibil, însă, din motive de lizibilitate și înțelegere, o anumită suprapunere este inevitabilă.

⁽¹⁾ A se vedea apendicele 1 pentru definiții și unități

⁽²⁾ În sensul Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH) (JO L 396, 30.12.2006, p. 1), acest aspect este abordat în documentul „Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment”, Capitolul R.7c, R.7.10.3.1, R.7.10.4.1 și figura R7.10-2.

PRINCIPIUL TESTULUI

Se pot utiliza condiții în flux continuu sau semistatice (a se vedea punctul 4); se recomandă condițiile în flux continuu pentru a limita potențiala expunere a substanței de testat prin apă ca rezultat al oricărei desorbții din hrana îmbogățită sau fecale. Testul este constituit din două faze: absorbția (alimente îmbogățite cu substanța de testat) și eliminarea (hrană curată, netratată) (a se vedea punctul 16). În cursul fazei de absorbție, un grup „de testat” de pești este hrănit cu un regim stabilit de hrană comercială pentru pești, cu compoziție cunoscută, îmbogățită cu substanța de testat, în fiecare zi. În mod ideal, peștii trebuie să consume toată hrana oferită (a se vedea punctul 141). Ulterior, peștii sunt hrăniți cu hrană comercială pentru pești, pură, netratată în cursul fazei de eliminare. În ceea ce privește metoda expunerii prin apă, se pot utiliza mai multe grupuri de testat cu diferite concentrații ale substanței de testat îmbogățită, dacă este necesar, dar pentru majoritatea substanțelor de testat organice puternic hidrofoabe este suficient un singur grup de testare (a se vedea punctele 49 și 107). În cazul în care se utilizează condiții semistatice, peștii se transferă într-un mediu nou și/sau o nouă cameră de testare la sfârșitul fazei de absorbție (în cazul în care mediul și/sau aparatele utilizate în faza de absorbție au fost contaminate cu substanță de testat prin percolare). Se măsoară concentrațiile substanței de testat din pești în ambele faze ale testului. În plus față de grupul de pești hrăniți cu dieta îmbogățită (grupul de testat), un grup martor de pești este menținut în condiții identice și hrănit în mod identic, cu excepția faptului că hrana comercială pentru pești nu este îmbogățită cu substanța de testat. Acest grup martor permite ca nivelurile de fond ale substanței de testat să fie cuantificate în peștele neexpus și se utilizează ca punct de comparație pentru orice efect advers legat de tratament observat în grupul (grupurile) de testat⁽¹⁾. Aceasta permite, de asemenea, comparații între constantele de viteză de creștere între grupuri ca o verificare a faptului că au fost consumate cantități similare din hrana furnizată (se iau în considerare, de asemenea, eventualele diferențe în ceea ce privește caracteristicile organoleptice ale regimurilor alimentare în explicarea diferitelor constante de viteză de creștere; a se vedea punctul 138). Este important ca, în timpul atât al fazelor de absorbție, cât și de eliminare, grupurile de testat și martor să fie hrănite cu diete echivalente din punct de vedere nutrițional.

O fază de absorbție care durează 7-14 de zile este suficientă, în general, pe baza experienței dezvoltatorilor metodei (38) (39). Acest interval reduce la minimum costurile efectuării testului, asigurând în același timp o expunere suficientă pentru majoritatea substanțelor. Cu toate acestea, în unele cazuri, faza de absorbție poate fi prelungită (a se vedea punctul 127). În cursul fazei de absorbție, concentrația substanței din pești poate să nu atingă starea staționară, astfel încât datele cu privire la tratament și rezultatele acestei metode se bazează, de regulă, pe o analiză cinetică a reziduurilor tisulare. (Notă: Ecuațiile de estimare a timpului până la starea staționară se pot aplica și în cazul de față la fel ca în cazul testului de expunere prin apă- a se vedea appendicele 5). Faza de eliminare începe atunci când peștii sunt hrăniți prima dată cu hrană neîmbogățită și durează, în general, până la 28 de zile sau până când substanța de testat nu mai poate fi cuantificată în peștele întreg, luându-se în considerare varianta cea mai scurtă. Faza de eliminare poate fi scurtată sau prelungită dincolo de 28 de zile, în funcție de variația în timp a concentrațiilor chimice măsurate și de dimensiunile peștilor.

Această metodă permite să se determine timpul de înjumătățire specific substanței ($t_{1/2}$, din constanta de viteză de eliminare, k_d), eficiența asimilării (absorbția în intestine; a), factorul de bioamplificare dietetică cinetică (BMF_K), factorul de bioamplificare dietetică cinetică corectat de creștere (BMF_{K_c}), precum și factorul de bioamplificare dietetică cinetică corectat de lipide⁽²⁾ (BMF_{K_L}) (și/sau factorul de bioamplificare dietetică cinetică corectat de creștere și lipide, $BMF_{K_{CL}}$) pentru substanța de testat în pește. În ceea ce privește metoda expunerii prin apă, creșterea în greutate a peștelui în timpul testului va avea ca rezultat diluția substanței de testat în peștii care cresc și, prin urmare, BMF (cinetică) va fi subestimat dacă nu va fi corectat pentru creștere (a se vedea punctele 162 și 163). În plus, în cazul în care se estimează că s-a ajuns la starea staționară în faza de absorbție, se poate calcula un BMF în stare staționară orientativ. Există abordări disponibile care fac posibilă estimarea unui factor de bioconcentrare cinetică (BCF_K) pe baza datelor generate în studii prin alimentație [de exemplu, (44) (45) (46) (47) (48)]. În appendicele 8 se discută avantajele și dezavantajele unor astfel de abordări.

Testul a fost conceput în principal pentru substanțe organice nepolare greu solubile care urmăresc aproximativ cinetica de ordinul întâi și de eliminare în pești. În cazul în care se testează o substanță care nu urmează cinetica de absorbție și de eliminare de ordinul întâi, se utilizează modele mai complexe (a se vedea referințele din appendicele 5) și se solicită consiliere din partea unui biostatistician și/sau a unui specialist în farmacocinetică.

(1) Pentru majoritatea substanțelor de testat, în mod ideal nu trebuie să existe nicio detecție în apa martor. Concentrațiile de bază trebuie să fie relevante numai pentru materialele naturale (de exemplu, unele metale) și substanțele care sunt omniprezente în mediul înconjurător.

(2) Întrucât BMF este definit ca raportul dintre concentrația unei substanțe într-un organism cu cea din alimentele organismului la starea staționară, se iau în considerare lipidele prin corectarea în funcție de conținutul lipidic din organism și din alimente, prin urmare este descrisă mai precis ca o „corecție”. Această abordare diferă de „normalizarea” la un conținut lipidic în organism stabilit, astfel cum se efectuează în testul de bioconcentrare cu expunere prin apă.

BMF se determină în mod normal utilizând analiza substanței de testat din pește întreg (pe baza greutateii umede). În cazul în care acest lucru prezintă interes pentru obiectivele studiului, se pot eșantiona anumite țesuturi (de exemplu, mușchi, ficat) dacă peștii sunt împărțiți în părți comestibile și necomestibile (a se vedea punctul 21). În plus, se poate utiliza îndepărtarea și analiza separată a tractului gastrointestinal pentru a determina contribuția la concentrații în pești întregi pentru puncte de eșantionare la finalul fazei de absorbție și la începutul fazei de eliminare sau ca parte a unei abordări a echilibrului masic.

Se măsoară conținutul lipidic al peștilor întregi eșantionați, astfel încât concentrațiile să poată fi corectate pentru lipide, luând în considerare conținutul lipidic atât al alimentației, cât și al peștilor (a se vedea punctele 56 și 57 și appendicele 7).

Se măsoară și se înregistrează greutatea peștilor eșantionați și se asociază cu concentrațiile chimice analizate pentru peștii respectivi (de exemplu, se raportează utilizând un cod unic de identificare pentru fiecare pește eșantionat) în scopul calculării creșterii care se poate produce în timpul testului. Se măsoară, de asemenea, lungimea totală a peștelui, acolo unde este posibil ⁽¹⁾. Datele cu privire la greutate sunt necesare, de asemenea, pentru a estima BCF utilizând date privind eliminarea din testul prin alimentație.

INFORMAȚII CU PRIVIRE LA SUBSTANȚA DE TESTAT

Este necesar ca informațiile referitoare la substanța de testat, astfel cum sunt descrise la punctele 3 și 22, să fie disponibile. O metodă analitică pentru concentrațiile substanței de testat în apă nu este necesară, de regulă; sunt necesare metode cu sensibilitate adecvată pentru măsurarea concentrațiilor în hrana și țesuturile peștilor.

Metoda poate fi utilizată pentru a testa mai multe substanțe în cadrul unui singur test. Cu toate acestea, substanțele de testat trebuie să fie compatibile între ele astfel încât acestea să nu interacționeze sau să își schimbe identitatea chimică la îmbogățirea alimentelor pentru pești. Obiectivul este ca rezultatele măsurătorilor pentru fiecare substanță testată împreună să nu difere în mare măsură de rezultatele care ar fi furnizate în cazul în care ar fi fost operate teste individuale pentru fiecare substanță de testat. Activitatea analitică preliminară stabilește faptul că fiecare substanță poate fi recuperată dintr-o probă alimentară și tisulară de pește îmbogățită cu mai multe substanțe cu i) recuperări ridicate (de exemplu, > 85 % din valoarea nominală) și ii) sensibilitatea necesară pentru testare. Doza totală a substanțelor testate împreună trebuie să se situeze sub nivelul concentrației combinate care ar putea cauza efecte toxice (a se vedea punctul 51). În plus, posibilele efecte adverse la pește și potențialul efectelor interactive (de exemplu, efecte metabolice) asociate cu testarea mai multor substanțe în mod simultan se iau în considerare în modelul experimental. Se evită testarea simultană a substanțelor ionizabile. În ceea ce privește expunerea, metoda este adecvată, de asemenea, pentru amestecuri complexe (a se vedea punctul 13, cu toate că se vor aplica aceleași limitări în analiză ca pentru orice altă metodă).

VALIDITATEA TESTULUI

Pentru ca un test să fie valid, se aplică următoarele condiții (a se vedea punctul 24):

- Variația de temperatură a apei este mai mică de ± 2 °C în grupurile de tratament și martor
- Concentrația oxigenului dizolvat nu coboară sub 60 % din valoarea de saturație din aer
- Concentrația substanței de testat în hrana pentru pești înaintea și la sfârșitul fazei de absorbție se încadrează în intervalul ± 20 % (pe baza a cel puțin trei eșantioane în ambele momente)
- Se demonstrează un nivel ridicat de omogenitate a substanței în hrană, în activitatea analitică preliminară a dietei îmbogățite; cel puțin trei concentrații ale probelor de substanță prelevate la începutul testului nu trebuie să varieze cu mai mult de 15 % de la valoarea medie

⁽¹⁾ Lungimea totală se înregistrează, de asemenea, în timpul testării, deoarece este un bun indicator pentru a stabili dacă s-a produs un efect advers.

- Concentrațiile substanței de testat nu sunt detectate sau sunt prezente doar la niveluri tipice de urme în hrana neîmbogățită sau în țesuturile peștilor martor în raport cu probele tratate
- Mortalitatea sau alte efecte adverse/maladii atât în grupul martor de pești, cât și în cel de testat trebuie să fie $\leq 10\%$ la sfârșitul testului; în cazul în care testul se prelungește din orice motiv, efectele adverse în ambele grupuri sunt $\leq 5\%$ pe lună și $\leq 30\%$ cumulate. Diferențele semnificative în ceea ce privește creșterea medie între grupul de testare și cel martor de pești de la care au fost eșantionate probe ar putea fi o indicație a unui efect toxic al substanței de testat.

SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

În cazul în care un laborator nu a mai realizat anterior testul sau au fost efectuate modificări substanțiale (de exemplu, schimbarea sușei de pești sau a furnizorului, specii diferite de pești, modificare semnificativă a dimensiunii peștelui, a hranei pentru pești sau a metodei de îmbogățire etc.), se recomandă efectuarea unui studiu de competență tehnică utilizând o substanță de referință. Substanța de referință este utilizată în primul rând pentru a stabili dacă tehnica de îmbogățire este adecvată pentru a asigura un grad maxim de omogenitate și biodisponibilitate al substanțelor de testat. Un exemplu care a fost utilizat în cazul substanțelor nepolare hidrofobe este hexaclo-robenzenul (HCB), dar se iau în considerare și alte substanțe cu date fiabile disponibile privind absorbția și bioamplificarea datorită proprietăților periculoase ale HCB ⁽¹⁾. În cazul în care se utilizează o astfel de substanță, în raportul de testare se prezintă informații de bază privind substanța de referință, inclusiv denumirea, puritatea, numărul CAS, structura, date de toxicitate (dacă sunt disponibile) la fel ca pentru substanțele de testat (a se vedea punctele 3 și 22).

DESCRIEREA METODEI

Aparatură

Se utilizează materiale și aparate astfel cum este descris în metoda expunerii prin apă (a se vedea punctul 26). Se utilizează un sistem de testare în flux continuu sau semistatic care furnizează un volum suficient de apă de diluție în bazinele de testare. Se înregistrează debitul.

Apă

Se utilizează apă de testare astfel cum este descris în metoda de expunere prin apă (a se vedea punctele 27-29). Mediul de testare se caracterizează astfel cum este descris și calitatea acestuia trebuie să se mențină constantă în timpul testului. Conținutul în particule naturale și carbonul organic total trebuie să fie cât mai scăzute posibil (≤ 5 mg/l materie în particule; ≤ 2 mg/l carbon organic total) înainte de începerea testului. COT necesită măsurarea numai înainte de testare ca parte a caracterizării apei de testare (a se vedea punctul 53).

Regimul alimentar

Se recomandă hrana pentru pește disponibilă comercial (alimente peletizate care plutesc și/sau se scufundă lent) care este caracterizată cel puțin în ceea ce privește conținutul de proteine și de grăsimi. Produsul alimentar trebuie să aibă o dimensiune uniformă a peletei pentru a spori eficiența expunerii prin alimentație, și anume peștii vor consuma mai multă hrană în loc să consume bucățile mai mari și să le evite pe cele mai mici. Peletele se dimensionează corespunzător dimensiunii peștilor la începutul testului (de exemplu, se poate utiliza un diametru al peletei de aproximativ 0,6-0,85 mm pentru pești între 3 și 7 cm lungime totală și de 0,85-1,2 mm pentru pești între 6 și 12 cm lungime totală). Se poate ajusta dimensiunea peletei în funcție de creșterea peștilor la începutul fazei de eliminare. În apendicele 7 este prezentat un exemplu de compoziție alimentară adecvată, astfel cum este furnizată comercial. Regimurile alimentare de testare cu un conținut lipidic total între 15 și 20 % (g/g) au fost utilizate frecvent la elaborarea acestei metode. Hrana pentru pești cu o concentrație de lipide atât de ridicată ar putea să nu fie disponibilă în unele regiuni. În astfel de cazuri, studiile se pot efectua cu un nivel inferior de concentrație lipidică în produsul alimentar și, în cazul în care este necesar, se ajustează rata de alimentare în mod corespunzător pentru a menține sănătatea peștilor (pe baza testării preliminare). Conținutul lipidic total din grupul de testare și grupul martor trebuie să fie măsurat și înregistrat înainte de începerea testului și la sfârșitul fazei de absorbție. În raportul de studiu se prezintă datele furnizate de furnizorul comercial de furaje cu privire la analiza nutritivă, umiditate, fibre și cenușă și, dacă este posibil, reziduurile de minerale și de pesticide (de exemplu, poluanții prioritari „standard”).

⁽¹⁾ HCB este enumerat în anexele A și C la Convenția de la Stockholm și în anexele I și III la Regulamentul (CE) nr. 850/2004 privind poluanții organici persistenți (JO L 158, 30.4.2004, p. 7)

La îmbogățirea alimentelor cu substanța de testat, se depun toate eforturile posibile pentru a se asigura omogenitatea pe toată durata testului. Se selectează concentrația substanței de testat în alimente pentru grupul de testare, luând în considerare sensibilitatea tehnicii analitice, toxicitatea substanței de testat (CFEO, dacă se cunoaște), precum și proprietățile fizico-chimice relevante. În cazul în care se utilizează, substanța de referință se include, de preferință, la o concentrație de aproximativ 10 % din cea a substanței de testat (sau, în orice caz, cât mai scăzută posibil), se supune unei analize de sensibilitate (de exemplu, pentru hexaclorbenzen, o concentrație în alimente de 1-100 µg/g a fost considerată acceptabilă; a se vedea punctul (47) pentru informații suplimentare privind eficiența de asimilare a HCB].

Substanța de testat poate fi adăugată în hrana pentru pești în mai multe moduri, în funcție de caracteristicile fizice ale acesteia și de solubilitate (a se vedea appendicele 7 pentru mai multe detalii privind metodele de îmbogățire):

- În cazul în care substanța este solubilă și stabilă în trigliceride, aceasta se dizolvă într-o cantitate mică de ulei de pește sau ulei vegetal comestibil înainte de a fi amestecată cu hrana pentru pești. În acest caz, se acordă atenție deosebită pentru a se evita producerea unui raport prea bogat în lipide, luând în considerare conținutul de lipide naturale ale hranei îmbogățite prin adăugarea cantității minime cunoscute de ulei necesară pentru a atinge distribuția și omogenitatea substanței de testat în hrană, sau;
- Hrana se îmbogățește utilizând un solvent organic corespunzător, atât timp cât nu se compromite omogenitatea și biodisponibilitatea [este posibil ca substanța de testat să formeze (micro)cristale în alimente ca urmare a evaporării solventului și nu există soluții facile pentru a demonstra că acest lucru nu a avut loc; a se vedea (49)] sau;
- Lichidele nevâscoase se adaugă direct în hrana pentru pești, dar acestea se amestecă foarte bine pentru a susține omogenitatea și pentru a facilita buna asimilare. Tehnica de amestecare trebuie să asigure omogenitatea alimentelor îmbogățite.

Într-un număr redus de cazuri, de exemplu substanțele de testat mai puțin hidrofobe pentru care desorbția din hrană este mai susceptibilă, este posibil să fie necesară acoperirea peletelor pregătite din hrană cu o cantitate mică de ulei de porumb/pește (a se vedea punctul 142). În astfel de cazuri, hrana martor se tratează în mod similar și hrana finală preparată se utilizează pentru măsurarea lipidelor.

În cazul în care se utilizează, rezultatele substanței de referință trebuie să fie comparabile cu datele din studiile de specialitate efectuate în condiții similare, cu o rație alimentară comparabilă (a se vedea punctul 45) și parametrii de referință specifici substanței trebuie să îndeplinească criteriile relevante de la punctul 113 (al 3-lea, al 4-lea și al 5-lea subpunct).

În cazul în care se utilizează un ulei sau un solvent purtător ca vehicul pentru substanța de testat, o cantitate echivalentă din același vehicul (fără substanța de testat) se amestecă cu alimentația martor în vederea menținerii echivalenței cu alimentele îmbogățite. Este important ca, în timpul atât al fazelor de absorbție, cât și de eliminare, grupurile de testat și martor să fie hrănite cu diete echivalente din punct de vedere nutrițional.

Alimente îmbogățite se păstrează în condiții care să mențină stabilitatea substanței de testat în amestecul de hrană (de exemplu, refrigerare) și aceste condiții se raportează.

Alegerea speciilor de pești

Pot fi utilizate speciile de pești specificate pentru expunerea prin apă (a se vedea punctul 32 și appendicele 3). Păstrăvul-curcubeu (*Oncorhynchus mykiss*), crapul (*Cyprinus carpio*) și peștii din specia *Pimephales promelas* au fost utilizați frecvent în studiile de bioacumulare alimentară cu substanțe organice înainte de publicarea prezentei metode de testare. Speciile de testare trebuie să aibă un comportament de hrănire care are ca rezultat consumul rapid al rației alimentare administrate pentru a se asigura că orice factor care influențează concentrația substanței de testat în alimente (de exemplu, percolarea în apă și posibilitatea expunerii prin apă) este menținut la un nivel minim. Se utilizează pește în intervalul de dimensiune/greutate recomandat (a se vedea appendicele 3). Peștii nu trebuie să fie prea mici astfel încât să împiedice facilitarea analizelor pe bază individuală. Speciile testate în timpul unei etape de viață cu creștere rapidă pot complica interpretarea datelor și ratele de creștere ridicate pot influența calcularea eficienței de asimilare ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Pentru o creștere rapidă în timpul fazei de absorbție, rația alimentară reală va scădea sub nivelul stabilit la începutul expunerii.

Păstrarea peștilor

Criteriile privind aclimatizarea, mortalitatea și acceptarea bolilor sunt aceleași ca pentru metoda expunerii prin apă înainte de a testa conductanța (a se vedea punctele 33-35).

DESFĂȘURAREA TESTULUI

Activitățile desfășurate înainte de studiu și testul de stabilire a intervalului

Sunt necesare activități analitice desfășurate înainte de studiu pentru a demonstra recuperarea substanței din produsele alimentare îmbogățite/țesutul de pește îmbogățit. Un test de stabilire a intervalului pentru a selecta o concentrație adecvată în produsele alimentare nu este întotdeauna necesar. În scopul de a demonstra că nu se observă efecte adverse și pentru a evalua caracteristicile organoleptice ale unei diete îmbogățite, sensibilitatea metodei analitice pentru țesutul și hrana pentru pește, precum și selecția unei rate de alimentare și a intervalelor de eșantionare a probelor adecvate din timpul fazei de eliminare etc., se pot efectua experimente de hrănire preliminară, însă acest lucru nu este obligatoriu. Un studiu preliminar poate fi util pentru a estima numărul de exemplare necesar pentru eșantionare în cursul fazei de eliminare. Acest lucru poate conduce la o reducere semnificativă a numărului de pești utilizați, în special în cazul substanțelor de testat care sunt deosebit de susceptibile la metabolizare.

Condiții de expunere

Durata fazei de absorbție

Este suficientă, de regulă, o fază de absorbție de 7-14 zile, în cursul căreia un grup de pești este hrănit cu alimentația martor și un alt grup, cu alimentația de testat, în fiecare zi, la un anumit regim, în funcție de speciile testate și de condițiile experimentale, de exemplu între 1-2 % din greutatea corporală (greutate umedă) în cazul păstrăvului-curcubeu. Rata de alimentare se selectează astfel încât să se evite creșterea rapidă și mărirea considerabilă a conținutului lipidic. Dacă este necesar, faza de absorbție poate fi prelungită pe baza experienței practice din studii anterioare sau a cunoștințelor cu privire la absorbția/eliminarea substanței de testat (sau a unui analog) la pești. Începutul testului este definit ca momentul primei hrăniri cu alimente îmbogățite. O zi experimentală începe la momentul hrănirii și se termină cu puțin timp înainte de următoarea hrănire (de exemplu, o oră). Prin urmare, prima zi experimentală de absorbție durează de la prima hrănire cu alimente îmbogățite și se termină cu puțin timp înainte de a doua hrănire cu alimente îmbogățite. În practică, faza de absorbție se încheie cu puțin timp înainte (de exemplu, o oră) de prima hrănire cu substanță de testat neîmbogățită, având în vedere faptul că peștele va continua să digere hrana îmbogățită și să absoarbă substanța de testat în intervalul de 24 de ore. Este important să se asigure că se atinge un conținut corporal suficient de ridicat (netoxic) de substanță de testat în ceea ce privește metoda analitică, astfel încât să se poată măsura cel puțin un ordin de mărime în scădere în timpul fazei de eliminare. În cazuri speciale, se poate utiliza o fază de absorbție prelungită (până la 28 zile), cu eșantionare suplimentară pentru a obține o imagine de ansamblu asupra cineticii de absorbție. În timpul absorbției, concentrația în pește poate să nu atingă starea staționară. Ecuații pentru estimarea timpului până la starea staționară, indicând durata probabilă necesară pentru a atinge concentrații semnificative în pește, pot fi aplicate în acest caz la fel ca în testul cu expunere prin apă (a se vedea appendicele 5).

În unele cazuri, se poate cunoaște faptul că absorbția substanței în pește timp de 7-14 zile va fi insuficientă pentru ca concentrațiile de hrană să atingă o concentrație în pește destul de ridicată pentru a analiza cel puțin un ordin de mărime în scădere în timpul eliminării, fie din cauza calității slabe a sensibilității analitice sau a eficienței scăzute de asimilare. În astfel de cazuri, poate fi mai avantajos să se extindă faza inițială de hrănire pentru mai mult de 14 zile sau, în special pentru substanțele rapid metabolizabile, să se ia în considerare o concentrație alimentară mai ridicată. Cu toate acestea, se acordă atenție deosebită la menținerea conținutului corporal în timpul absorbției sub nivelul cronic (estimat) al concentrației la care nu se observă niciun efect (CFEO) în țesutul peștilor (a se vedea punctul 138).

Durata fazei de eliminare

Eliminarea durează, în general, până la 28 de zile, începând din momentul în care grupul de pești de testat sunt hrăniți cu hrană pură, netratată după faza de absorbție. Eliminarea începe cu prima hrănire cu hrană „neîmbogățită” mai degrabă decât imediat după ultima hrănire cu hrană „îmbogățită”, întrucât peștii continuă să digere alimentele și să absoarbă substanța de testat în intervalul de 24 de ore, astfel cum se menționează la punctul 126. Prin urmare, primul eșantion în faza de eliminare este prelevat cu puțin timp înainte de a doua hrănire cu hrană neîmbogățită. Această perioadă de eliminare este concepută pentru a capta substanțele cu un potențial timp de înjumătățire de până la 14 de zile, care este în concordanță cu cel al substanțelor bioacumulabile ⁽¹⁾, astfel încât 28 de zile cuprind doi timpi de înjumătățire ai unor astfel de substanțe. În cazul substanțelor foarte bioacumulative, poate fi mai avantajos să se prelungească faza de eliminare (dacă acest lucru este indicat prin testări preliminare).

În cazul în care o substanță este eliminată foarte încet, astfel încât un timp de înjumătățire nu poate fi determinat în faza de eliminare, informațiile pot fi suficiente, cu toate acestea, în scopuri evaluative pentru a indica un nivel ridicat de bioacumulare. Pe de altă parte, în cazul în care o substanță este eliminată atât de repede încât nu se poate stabili o concentrație la timpul zero fiabilă (concentrația la finalul absorbției/începutul eliminării, $C_{0,d}$) și k_2 nu poate fi stabilit, se poate efectua o estimare conservatoare a k_2 (a se vedea apendicele 7).

În cazul în care analizele peștilor la intervale mai scurte (de exemplu, 7 sau 14 zile) arată că substanța s-a eliminat sub niveluri cuantificabile înainte de perioada completă de 28 de zile, eșantionarea ulterioară poate fi întreruptă, iar testul încheiat.

În puține cazuri s-a produs o absorbție nemăsurabilă a substanței de testat la sfârșitul perioadei de absorbție (sau cu un al doilea eșantion de eliminare). În cazul în care se poate demonstra că: i) se îndeplinesc criteriile de valabilitate de la punctul 113; și ii) lipsa absorbției nu se datorează altor deficiențe ale testului (de exemplu, durată de absorbție insuficient de lungă, deficiență a tehnicii de îmbogățire a hranei, conducând la o biodisponibilitate scăzută, lipsa de sensibilitate a metodei analitice, neconsumarea alimentelor de către pești etc), studiul se poate încheia fără necesitatea de reefectuare cu o durată de absorbție mai lungă. În cazul în care activitățile preliminare au indicat faptul că acesta ar putea fi un astfel de caz, se recomandă analizarea materiilor fecale, dacă este posibil, ca parte a unei abordări a „echilibrului masic”.

Numărul de pești de experiență

Similar testului de expunere prin apă, se selectează pești de greutate și lungime similare, cu cel mai mic pește având nu mai puțin de două treimi din greutatea celui mai mare (a se vedea punctele 40-42).

Numărul total de pești pentru studiu se selectează pe baza calendarului de eșantionare (un număr minim de un eșantion la finalul fazei de absorbție și patru până la șase eșantioane în cursul fazei de eliminare, dar în funcție de duratele fazelor), luând în considerare sensibilitatea tehnicii analitice, concentrația susceptibilă de a fi atinsă la sfârșitul fazei de absorbție (pe baza cunoștințelor anterioare) și durată de eliminare (în cazul în care cunoștințele anterioare permit estimarea). Se eșantionează cinci până la zece pești la fiecare eveniment, parametrii de dezvoltare (greutate și lungime totală) fiind măsurați înainte de analiza chimică sau lipidică.

Având în vedere variabilitatea inerentă în ceea ce privește dimensiunea, rata de creștere și fiziologia în rândul peștilor și variația probabilă în ceea ce privește cantitatea de hrană administrată consumată de fiecare pește, se eșantionează cel puțin cinci pești la fiecare interval din grupul de testare și cinci pești din grupul martor pentru a stabili în mod adecvat concentrația medie și caracterul variabil al acesteia. Variabilitatea între peștii utilizați este susceptibilă să contribuie mai mult la variabilitatea totală necontrolată în test decât variabilitatea inerentă în metodologiile analitice utilizate și, prin urmare, justifică utilizarea a până la zece pești pentru fiecare punct de prelevare în unele cazuri. Cu toate acestea, în cazul în care concentrațiile de fond ale substanței de testat în peștii martor nu sunt cuantificabile la începutul eliminării, analiza chimică a doi-trei pești martor numai la intervalul de eșantionare final poate fi suficientă atât timp cât peștii martor rămași la toate punctele de eșantionare sunt eșantionați în continuare pentru greutate și lungime totală (astfel încât același număr sunt eșantionați din grupurile de testat și martor pentru creștere). Peștele se păstrează, se cântărește în mod individual, (inclusiv dacă ulterior se dovedește necesară combinarea rezultatelor eșantioanelor) și se măsoară lungimea totală.

⁽¹⁾ Într-un studiu de expunere prin apă, un timp de înjumătățire de 14 zile ar corespunde unui BCF de aproximativ 10 000 L/kg utilizând pești de 1 g cu o rată de absorbție corespunzătoare de aproximativ 500 l/kg/zi [în conformitate cu ecuația lui Sijm *et al* (46)].

Pentru un test standard, de exemplu cu o durată de eliminare de 28 de zile, incluzând cinci eșantioane de eliminare, acest lucru înseamnă un total de 59-120 de exemplare din grupul de testat și 50-110 din grupul martor, presupunând că tehnica analitică a substanței permite efectuarea analizei conținutului lipidic pe aceiași pești. În cazul în care analiza lipidică nu poate fi efectuată pe aceiași pești ca analiza chimică și, de asemenea, utilizarea peștilor martor numai pentru analiza lipidică nu este fezabilă (a se vedea punctul 56), ar fi necesari 15 pești suplimentari (trei din populația stoc la începutul testului, câte trei din grupul martor și din grupul de testare la începutul eliminării și câte trei din grupul martor și grupul de testare la sfârșitul experimentului). În apendicele 4 se prezintă un exemplu de calendar de eșantionare cu numărul de pești.

Încărcarea

Se utilizează raporturi apă/pești mărite similare celor utilizate în metoda de expunere prin apă (a se vedea punctele 43 și 45). Cu toate că regimurile de încărcare pești/apă nu au un efect asupra concentrațiilor de expunere în cadrul acestui test, se recomandă un regim de încărcare de 0,1-1,0 g de pește (greutate umedă) la litru de apă pe zi pentru a menține concentrații adecvate de oxigen dizolvat și pentru reduce la minimum stresul organismelor de testare.

Alimentația de testare și hrana

Pe parcursul perioadei de aclimatizare, peștii sunt hrăniți cu o alimentație corespunzătoare, astfel cum este descris mai sus (punctul 117). În cazul în care testul se efectuează în regim dinamic, debitul se suspendă atunci când peștii sunt hrăniți.

În timpul testului, alimentația pentru grupul de testare trebuie să adere la cele descrise mai sus (punctele 116-121). Pe lângă luarea în considerare a factorilor specifici substanței, a sensibilității analitice, a concentrației preconizate în alimentație în condiții de mediu și a nivelurilor de toxicitate cronică/conținut corporal, selecția concentrației țintă de îmbogățire trebuie să ia în considerare caracteristicile organoleptice ale hranei (astfel încât peștele să nu evite consumul). Concentrația cu îmbogățire nominală a substanței de testat se documentează în raport. Pe baza experienței acumulate, concentrațiile de îmbogățire încadrate în intervalul 1-1000 µg/g furnizează un interval de lucru practic pentru substanțele de testat care nu prezintă un anumit mecanism toxic. Pentru substanțele care acționează prin intermediul unui mecanism nespecific, nivelurile de reziduuri tisulare nu trebuie să depășească 5 µmol/g de lipide, având în vedere faptul că reziduurile peste acest nivel ar putea prezenta efecte cronice (19) (48) (50) ⁽¹⁾. În cazul altor substanțe, se acordă atenție deosebită ca în urma expunerii cumulate să nu se producă efecte adverse (a se vedea punctul 127). Acest lucru este valabil în special în cazul în care se testează mai mult de o substanță în mod simultan (a se vedea punctul 112).

Cantitatea corespunzătoare din substanța de testat pot fi utilizată pentru a îmbogăți hrana pentru pești prin trei metode, astfel cum sunt descrise la punctul 119 și în apendicele 7. Metodele și procedurile de îmbogățire a hranei se documentează în raport. Hrana netratată se administrează la peștii martor, conținând o cantitate echivalentă de vehicul de ulei neîmbogățit în cazul în care acesta a fost utilizat în hrana îmbogățită pentru faza de absorbție sau tratată cu solvent „pur” în cazul în care un solvent vehicul a fost utilizat pentru prepararea hranei pentru grupul de testare. Alimentația tratată și cea netratată se măsoară în mod analitic cel puțin în triplicat pentru concentrația substanței de testat înainte de începerea și la sfârșitul fazei de absorbție. După expunerea la alimentația tratată (faza de absorbție), peștii (ambele grupuri) sunt hrăniți cu hrană netratată (faza de eliminare).

Peștii sunt hrăniți cu un regim fix (în funcție de specie; de exemplu, aproximativ 1-2 % din greutatea corporală umedă în fiecare zi în cazul păstrăvului-curcubeu). Rata de alimentare se selectează astfel încât să se evite creșterea rapidă și mărirea considerabilă a conținutului lipidic. Se înregistrează rata de alimentare exactă stabilită în timpul experimentului. Hrănirea inițială trebuie să se bazeze pe măsurători de greutate programate ale populației stoc chiar înainte de începerea testului. Cantitatea de hrană se ajustează în funcție de greutatea umedă ale peștilor eșantionați la fiecare eveniment de eșantionare pentru a ține cont de creștere pe parcursul experimentului. Greutățile și lungimile peștilor în bazinele de testare și martor pot fi estimate din greutatea și lungimile totale ale peștilor utilizați la fiecare eveniment de eșantionare; nu se cântărește sau măsoară peștele rămas în bazinele de testare și martor. Este important să se mențină aceeași rata de alimentare fixată pe parcursul experimentului.

⁽¹⁾ Având în vedere faptul că concentrațiile interne efective pot fi determinate numai după efectuarea testului, este necesară o estimare a concentrației interne preconizate (de exemplu, pe baza BMF preconizat și a concentrației în hrană; a se vedea ecuația A5.8 în apendicele 5).

Hrănirea se observă pentru a asigura faptul că peștii consumă în mod vizibil toată hrana prezentată pentru a garanta utilizarea ratelor de ingestie corespunzătoare în calcule. Se iau în considerare experimentele de hrănire preliminară sau experiența anterioară la selectarea unei rate de alimentare care va garanta că toate produsele alimentare din alimentația pe o zi sunt consumate. În cazul în care produsele alimentare sunt neconsumate în mod sistematic, se poate recomanda să se împartă doza pe o perioadă de hrănire suplimentară în fiecare zi experimentală (de exemplu, înlocuirea hranei pe o zi cu jumătate din cantitatea respectivă, de două ori pe zi). În cazul în care acest lucru este necesar, a doua hrănire trebuie să se efectueze la un termen stabilit și să se programeze astfel încât să treacă o perioadă maximă posibilă de timp înainte de eșantionarea peștilor (de exemplu, timpul pentru a doua hrănire este stabilit în prima jumătate a unei zile experimentale).

Cu toate că, în general, peștii consumă rapid hrana, este important să se asigure că substanța rămâne adsorbită în produsele alimentare. Se depun eforturi pentru a evita ca substanța de testat să se disperseze din alimente în apă, expunând astfel peștii la concentrații apoase ale substanței de testat în plus față de administrarea prin alimentație. Acest lucru poate fi realizat prin înlăturarea hranei neconsumate (și a excrementelor) din bazinele de testare și martor în termen de o oră de la hrănire, dar de preferință în termen de 30 de minute. În plus, se poate utiliza un sistem în care apa este curățată în mod continuu printr-un filtru de carbon activ pentru a absorbi orice contaminant „dizolvat”. Sistemele în flux continuu pot contribui la îndepărtarea particulelor de hrană și a substanțelor dizolvate în mod rapid ⁽¹⁾. În unele cazuri, o tehnică de preparare a alimentelor îmbogățite ușor modificată poate contribui la atenuarea acestei probleme (a se vedea punctul 119).

Lumina și temperatura

Precum în cazul metodei de expunere prin apă (a se vedea punctul 48), se recomandă o fotoperioadă de la 12 la 16 ore și temperatura (± 2 °C) corespunzătoare speciei utilizate pentru testare (a se vedea appendicele 3). Tipul și caracteristicile iluminării trebuie să fie cunoscute și documentate.

Martori

Se utilizează un grup martor, cu pești care sunt hrăniți cu aceeași rată precum grupul de testat, dar fără prezența substanței de testat în hrană. În cazul în care s-a utilizat un ulei sau un solvent vehicul pentru a îmbogăți hrana grupului de testat, hrana pentru grupul martor trebuie să fie tratată în același mod, dar cu absența substanței de testat, astfel încât alimentația grupului de testat și cea a grupului martor să fie echivalente (a se vedea punctele 121 și 139).

Frecvența de măsurare a calității apei

Condițiile descrise în metoda expunerii prin apă se aplică și în acest caz, cu excepția faptului că COT nu trebuie măsurată decât înainte de test, ca parte a caracterizării apei de testare (a se vedea punctul 53).

Eșantionarea și analiza peștilor și a alimentației

Analiza eșantioanelor de alimentație

Se analizează eșantioane de alimentație de testat și martor cel puțin în triplicat pentru substanța de testat și pentru conținutul lipidic, cel puțin înainte de începutul și la sfârșitul fazei de absorbție. Metodele de analiză și procedurile pentru asigurarea omogenității hranei se includ în raport.

⁽¹⁾ Prezența substanței de testat în mediul de testare ca rezultat al excreției peștilor sau percolarea din hrană este posibil să nu fie complet evitabilă. Prin urmare, o opțiune este măsurarea concentrației substanței de testat în apă la sfârșitul perioadei de absorbție, în special în cazul în care se utilizează un regim semistatic, pentru a verifica dacă a avut loc o expunere prin apă.

Eșantioanele se analizează pentru substanța de testat prin metoda stabilită și validată. Se desfășoară activități înainte de studiu pentru a se stabili limita de cuantificare, procentul de recuperare, interferențele și viabilitatea analitică în matricea eșantionului destinată. În cazul în care se testează un material marcat radioactiv, se ține cont de considerații similare celor pentru metoda expunerii prin apă, cu înlocuirea analizei de apă cu analiza alimentației (a se vedea punctul 65).

Analiză peștelui

La fiecare eveniment de eșantionare a peștelui, se vor eșantiona 5-10 exemplare din grupurile de expunere și martor (în unele cazuri, se poate reduce numărul peștilor martor; a se vedea punctul 134).

Evenimentele de eșantionare trebuie să se desfășoare în același moment în fiecare zi experimentală (față de hrănirea experimentală) și se programează astfel încât probabilitatea ca hrana să rămână în intestine în timpul fazei de absorbție și în prima parte din faza de eliminare să fie minimizată pentru a preveni contribuții false la concentrațiile totale de substanță de testat (și anume, peștii eșantionați se îndepărtează la sfârșitul unei zile experimentale, luând în considerare faptul că o zi experimentală începe la momentul hrănirii și se sfârșește la momentul următoarei hrăniri, aproximativ 24 de ore mai târziu). Eliminarea începe cu prima hrănire cu alimente neîmbogățite; a se vedea punctul 128). Primul eșantion din faza de eliminare (eșantionat cu puțin timp înainte de a doua hrănire cu alimente neîmbogățite) este important, având în vedere faptul că extrapolarea cu o zi înainte de această măsurare se utilizează pentru a estima concentrația la momentul zero ($C_{0,d}$, concentrația în pește la sfârșitul absorbției/începutul eliminării). Opțional, se poate îndepărta tractul gastrointestinal al peștilor și analiza în mod separat la sfârșitul absorbției și în prima și a treia zi de eliminare.

La fiecare eșantionare, peștii se îndepărtează din ambele vase de testare și se tratează în aceeași modalitate ca cea descrisă pentru metoda prin apă (a se vedea punctele 61-63).

Se măsoară concentrațiile substanței de testat în peștele întreg (greutate umedă) cel puțin la sfârșitul fazei de absorbție și în cursul fazei de eliminare atât în grupul martor, cât și cel de testare. În cursul fazei de eliminare, se recomandă patru până la șase puncte de eșantionare (de exemplu, 1, 3, 7, 14 și 28 de zile). Opțional, se poate include un punct de eșantionare suplimentar după 1-3 zile de absorbție pentru a estima eficiența asimilării din faza liniară de absorbție a peștilor încă aproape de începutul perioadei de expunere. Există două abateri principale de la calendar: i) în cazul în care se utilizează o fază de absorbție prelungită pentru a investiga cineticele de absorbție, vor exista puncte de eșantionare suplimentare în timpul fazei de absorbție și, prin urmare, este necesară includerea de pești suplimentari (a se vedea punctul 126); ii) în cazul în care studiul a fost încheiat la sfârșitul fazei de absorbție din cauza unei absorbții nemăsurabile (a se vedea punctul 131). Peștii individuali eșantionați se cântăresc (și se măsoară lungimea totală a acestora) pentru a permite determinarea constantelor de viteză de creștere. Concentrațiile de substanță în anumite țesuturi de pește (comestibile și necomestibile) se pot măsura, de asemenea, la sfârșitul absorbției și la momente selectate în timpul eliminării. În cazul în care se testează un material marcat radioactiv, se ține cont de considerații similare celor pentru metoda expunerii prin apă, cu înlocuirea analizei apei cu analiza alimentației (a se vedea punctul 65).

Pentru utilizarea periodică a unei substanțe de referință (a se vedea punctul 25), este de preferat măsurarea concentrațiilor în grupul de testat la sfârșitul absorbției și la toate momentele de eliminare specificate pentru substanța de testat (pește întreg); concentrațiile necesită măsurare în grupul martor numai la sfârșitul absorbției (pește întreg). În anumite cazuri (de exemplu, dacă tehnicile de analiză pentru substanța de testat și pentru substanța de referință sunt incompatibile, astfel încât ar fi necesari pești suplimentari pentru a urma calendarul de eșantionare), se poate utiliza o abordare diferită, după cum urmează, pentru a reduce la minim numărul necesar de pești suplimentari. Concentrațiile de substanță de referință se măsoară în timpul eliminării numai în zilele 1, 3 și în alte două puncte de eșantionare, selectate astfel încât să se poată efectua estimări fiabile ale concentrației la timpul zero ($C_{0,d}$) și ale k_2 pentru substanța de referință.

În cazul în care este posibil, conținutul lipidic al fiecărui pește se determină la fiecare eșantionare sau cel puțin la începutul și la finalul fazei de absorbție și la finalul fazei de eliminare. (a se vedea punctele 56 și 67). În funcție de metoda analitică (a se vedea punctul 67 și appendicele 4), ar putea fi posibilă utilizarea aceluiași pești pentru determinarea atât a conținutului lipidic, cât și a concentrației substanței de testat. Acest lucru este preferat din motive legate de reducerea numărului de pești. Cu toate acestea, în cazul în care acest lucru nu este posibil, se poate utiliza aceeași abordare ca cea descrisă în metoda expunerii prin apă (a se vedea punctul 56 pentru opțiuni alternative de măsurare a lipidelor). Metoda utilizată pentru a cuantifica conținutul lipidic se documentează în raport.

Calitatea metodei analitice

Se efectuează controale de laborator pentru a se asigura caracterul specific, exactitatea, precizia și reproductibilitatea tehnicii analitice specifice substanței, precum și recuperări ale substanței de testat din pești și din hrană.

Măsurarea creșterii peștilor

La începutul testului se cântărește un eșantion de pești provenit din populația stoc (și se măsoară lungimea totală a acestora). Acești pești se eșantionează cu puțin timp înainte de prima hrănire cu alimente îmbogățite (de exemplu, o oră) și se repartizează la ziua experimentală 0. Numărul de pești pentru acest eșantion trebuie să fie cel puțin același cu cel pentru eșantioanele din timpul testului. Unii dintre pești pot fi aceiași care au fost utilizați pentru analiza lipidelor înainte de începutul fazei de absorbție (a se vedea punctul 153). La fiecare interval de eșantionare, peștii se cântăresc mai întâi și ulterior se măsoară lungimea acestora. Pentru fiecare pește, greutatea măsurată (și lungimea) se leagă de concentrația chimică analizată (și conținutul de lipide, dacă este cazul), utilizând, de exemplu, un cod unic de identificare pentru fiecare pește eșantionat. Măsurătorile acestor pești eșantionați se pot utiliza pentru a estima greutatea (și lungimea) peștilor rămași în bazinele de testat și martor.

Evaluarea experimentală

Se efectuează și se înregistrează zilnic observații ale mortalității. Se efectuează observații suplimentare privind efectele adverse, de exemplu pentru un comportament anormal sau o pigmentare, și se înregistrează. Peștii se consideră morți în cazul în care nu există nicio mișcare respiratorie și nu se poate detecta nicio reacție la un stimul mecanic ușor. Se îndepărtează orice pește mort sau în mod clar muribund.

DATE ȘI RAPORTARE

Interpretarea rezultatelor

Rezultatele testului se utilizează pentru a obține constanta de viteză de eliminare (k_2) în funcție de greutatea totală umedă a peștilor. Se calculează constanta de viteză de creștere, k_1 , bazată pe creșterea medie în greutate a peștilor și se utilizează pentru producerea constantei de viteză de eliminare corectată de creștere k_{2c} , dacă este cazul. În plus, se raportează eficacitatea asimilării (a ; absorbția din intestine), factorul de bioamplificare cinetică (BMF_k) (dacă este necesar, corectat de creștere, BMF_{kc}), valoarea acestuia corectată lipidic (BMF_{KL} sau BMF_{KCL} , în cazul în care a fost corectat de diluția de creștere) și rata de alimentare. De asemenea, în cazul în care se poate efectua o estimare a perioadei de timp până la starea staționară în faza de absorbție (de exemplu, 95 % din starea staționară sau $t_{95} = 3,0/k_2$), se poate include o estimare a BMF în starea staționară (BMF_{SS}) (a se vedea punctele 105 și 106 și appendicele 5) în cazul în care valoarea t_{95} indică faptul că condițiile pentru starea staționară ar fi fost îndeplinite. Aceeași corecție lipidică se aplică și acestui BMF_{SS} , precum și BMF derivat cinetic (BMF_k) pentru a genera o valoare corectată lipidic, BMF_{SSL} (a se nota faptul că nu există o procedură convenită disponibilă pentru a corecta un BMF în stare staționară pentru diluție de creștere). În appendicele 7 se prezintă formulele și exemple de calcule. Există abordări disponibile care fac posibilă estimarea unui factor de bioconcentrare cinetică (BCF_k) pe baza datelor generate în studiul prin alimentație. Aceste aspecte sunt prezentate în appendicele 8.

Date cu privire la greutatea/lungimea peștelui

Se prezintă sub formă tabelară, în mod separat pentru grupul de testat și cel martor, greutatea umedă și lungimea fiecărui pește pentru toate perioadele de timp, pentru fiecare zi de eșantionare în timpul fazei de absorbție [populația stoc la începutul absorbției; grupul martor și cel de testat pentru finalul absorbției și, dacă s-a efectuat, faza de început (de exemplu, zilele 1 și 3 de absorbție) și faza de eliminare (de exemplu, zilele 1, 2, 4, 7, 14, 28 pentru grupul martor și de testat)]. Greutatea este măsura preferată de creștere în scopuri de corecție de diluție a creșterii. A se vedea mai jos (punctele 162 și 163) și appendicele 5 pentru metoda (metodele) utilizate pentru a corecta datele pentru diluția de creștere.

Date cu privire la concentrația substanței de testat în pești

Măsurătorile reziduurilor de substanță de testat pentru fiecare pește (sau eșantioane din pești reunite, în cazul în care măsurătorile individuale nu sunt posibile), exprimate în concentrație de greutate umedă (g/g) sunt introduse într-un tabel pentru peștii de testat și martor pentru fiecare moment de eșantionare. În cazul în care a fost efectuată o analiză lipidică pentru fiecare pește eșantionat, atunci se pot obține și prezenta sub formă de tabel concentrații individuale corectate de lipide, în ceea ce privește concentrația lipidică (g/g lipidă).

- Măsurătorile reziduurilor de substanță de testat în fiecare pește (sau eșantioane din pești reunite, în cazul în care măsurătorile individuale nu sunt posibile, a se vedea punctul 66) pentru perioada de eliminare se convertesc în logaritmi naturali ale acestora și se reprezintă grafic în funcție de timp (zi). În cazul în care o inspecție vizuală a graficului arată în mod evident valori aberante, se poate aplica un test pentru detectarea valorilor aberante valid din punct de vedere statistic pentru a elimina punctele de date false, precum și o justificare documentată pentru omiterea acestora.
- Se calculează o corelație a celor mai mici pătrate liniare pentru datele de $\ln(\text{concentrație})$ în funcție de eliminare (zi). Panta și ordonata la origine ale liniei sunt raportate ca constanta de viteză de eliminare totală (k_2) și logaritm natural de concentrație la timpul zero derivate ($C_{0,d}$) (a se vedea apendicele 5 și apendicele 7 pentru detalii suplimentare). În cazul în care acest lucru nu este posibil din cauza faptului că concentrațiile se află sub limita de cuantificare pentru al doilea eșantion de eliminare, se poate efectua o estimare conservatoare a k_2 (a se vedea apendicele 7).
- Se calculează varianțele în panta și ordonata la origine ale liniei utilizând proceduri statistice standard și se evaluează și se prezintă intervalele de încredere de 90 % (sau 95 %) în jurul acestor rezultate.
- Se calculează, de asemenea, concentrația medie măsurată a peștilor pentru ultima zi de absorbție (concentrația la timpul zero măsurată, $C_{0,m}$) și se compară cu valoarea derivată $C_{0,d}$. În cazul în care valoarea derivată este mai mică decât valoarea măsurată, diferența poate sugera prezența de hrană îmbogățită nedigerată în intestine. În cazul în care valoarea derivată este mult mai mare decât valoarea măsurată, aceasta ar putea fi o indicație a faptului că valoarea derivată din datele de eliminare prin regresie liniară este eronată și se efectuează evaluarea din nou (a se vedea apendicele 7).

Viteza de eliminare și factorul de bioamplificare

Pentru a calcula factorul de bioamplificare din date, se obține mai întâi eficacitatea asimilării (absorbția substanței de testat în intestine, α). Pentru a efectua acest lucru, se utilizează ecuația A7.1 din apendicele 7, fiind necesar să se cunoască concentrația derivată în pește la timpul zero al fazei de eliminare ($C_{0,d}$), constanta de viteză de eliminare (totală) (k_2), concentrația în hrană ($C_{\text{hrană}}$), constanta de viteză de ingestie (I) și durata perioadei de absorbție (t). Panta și ordonata la origine a relației liniare între $\ln(\text{concentrație})$ și timpul de eliminare se raportează ca constanta de viteză de eliminare totală (k_2 = panta) și concentrația la timpul zero ($C_{0,d}$ = $e^{\text{ordonata la origine}}$), așa cum se prezintă mai sus. Valorile derivate se verifică pentru plauzibilitate biologică (de exemplu, eficacitatea de asimilare, ca fracție, nu este mai mare de 1). Se calculează (I) prin împărțirea masei alimentației la masa peștilor hrăniți în fiecare zi (dacă au fost hrăniți la 2 % din greutatea corporală, I va fi 0,02). Cu toate acestea, rata de alimentare utilizată la calcul ar putea necesita ajustare pentru creșterea peștilor (acest lucru poate fi realizat utilizând constanta de viteză de creștere cunoscută pentru a estima greutatea peștilor la fiecare moment în timpul fazei de absorbție; a se vedea apendicele 7). În cazurile în care k_2 și $C_{0,d}$ nu pot fi stabilite deoarece, de exemplu, concentrațiile au scăzut sub limita de detecție pentru al doilea eșantion de eliminare, se poate efectua o estimare conservatoare a k_2 și o „limită superioară” pentru BMF_k (a se vedea apendicele 7).

După ce se obține eficacitatea asimilării (α), se poate calcula factorul de bioamplificare prin înmulțirea α cu constanta de viteză de ingestie (I) și împărțirea la constanta de viteză de eliminare (totală) (k_2). În aceeași modalitate se calculează factorul de bioamplificare corectat pentru creștere, dar utilizând constanta de viteză de eliminare corectată pentru creștere (k_{2c} ; a se vedea punctele 162 și 163). Se poate obține o estimare alternativă a eficacității de asimilare în cazul în care analiza tisulară a fost efectuată pe pești eșantionați în faza inițială, liniară a fazei de absorbție; a se vedea punctul 151 și apendicele 7. Această valoare reprezintă o estimare independentă a eficacității de asimilare pentru un organism în esență neexpus (și anume, peștii sunt aproape la începutul fazei de absorbție). Eficacitatea de asimilare estimată din datele de eliminare este utilizată, de regulă, pentru a obține BMF .

Corecția de lipide și corecția de diluție de creștere

Creșterea peștilor în timpul fazei de eliminare poate conduce la o scădere a concentrațiilor chimice măsurate în pești, având ca efect faptul că constanta de viteză de eliminare totală k_2 este mai mare decât ar rezulta numai din procesele de eliminare (de exemplu, metabolism, egestie) (a se vedea punctul 72). Conținutul lipidic al peștilor de testat (care este strâns legat de bioacumularea substanțelor hidrofobe) și conținutul lipidic al alimentelor pot varia suficient în practică astfel încât să fie necesară corecția acestora pentru a prezenta factorii de bioamplificare într-un mod semnificativ. Factorul de bioamplificare se corectează pentru diluția de creștere (precum se corectează BCF cinetică în metoda de expunere prin apă) și pentru conținutul lipidic al alimentelor în raport cu cel al peștilor (factorul de corecție lipidică). Ecuatiile și exemple pentru aceste calcule sunt disponibile în apendicele 5 și respectiv, apendicele 7.

Pentru corectarea pentru diluția de creștere, se calculează constanta de viteză de eliminare corectată pentru creștere (k_{2c}) (a se vedea ecuațiile din apendicele 5). Această constantă de viteză de eliminare corectată pentru creștere (k_{2c}) este utilizată ulterior pentru a calcula factorul de bioamplificare corectat pentru creștere, astfel cum se prezintă la punctul 73. În unele cazuri, această abordare nu este posibilă. O abordare alternativă care eludează necesitatea corecției de diluție implică utilizarea datelor de eliminare cu privire la masa de substanță de testat pe pește (pește întreg) în locul datelor cu privire la masa obișnuită de substanță de testat pe unitate de masă de pește (concentrație). Acest lucru poate fi realizat cu ușurință, întrucât testele în conformitate cu această metodă trebuie să asocieze concentrațiile tisulare înregistrate de greutatea corporale individuale ale peștilor. În apendicele 5 se prezintă procedura simplă de efectuare a acestui lucru. Se remarcă faptul că k_2 se estimează și se înregistrează în continuare, inclusiv în cazul în care se utilizează această abordare alternativă.

Pentru corectarea pentru conținutul lipidic al alimentelor și al peștilor atunci când nu a fost efectuată o analiză lipidică a peștilor eșantionați, se obțin raporturile medii de lipide (g/g) în pești și în alimente⁽¹⁾. Se calculează ulterior factorul de corecție de lipide (L_c) prin împărțirea raportului mediu de lipide din pește la raportul mediu de lipide din alimente. Factorul de bioamplificare, corectat sau nu pentru creștere, după caz, se împarte la factorul de corecție lipidică pentru a calcula factorul de bioamplificare corectat pentru lipide.

În cazul în care au fost efectuate analize chimice și lipidice pe aceiași pești la fiecare punct de eșantionare, se pot utiliza datele tisulare corectate pentru lipide pentru fiecare pește pentru a calcula un BMF corectat pentru lipide în mod direct (a se vedea punctul 37). Reprezentarea grafică a datelor cu privire la concentrația corectată pentru lipide furnizează $C_{0,d}$ pe bază de lipide și k_2 . Se poate realiza ulterior analiza matematică utilizând aceleași ecuații din apendicele 7, dar eficacitatea asimilării (a) se calculează utilizând constanta de viteză de ingestie a alimentației corectată pentru lipide (I_{lipid}) și concentrația alimentară pe bază de lipide ($C_{hrană-lipid}$). Parametrii lipidici corecți sunt utilizați, de asemenea, ulterior pentru a calcula BMF (a se observa faptul că, de asemenea, constanta de corecție de creștere se aplică raportului lipidic, mai degrabă decât greutatea umedă a peștilor pentru a calcula BMF corectat pentru lipide, corectat pentru creștere BMF_{Kcl}).

Interpretarea rezultatelor

Creșterea medie în grupul de testare și în cel martor, în principiu, nu trebuie să fie diferită în mod semnificativ, pentru a exclude efecte toxice. Se compară constantele de viteză de creștere sau curbele de creștere a celor două grupuri printr-o procedură adecvată⁽²⁾.

Raport de testare

După încheierea studiului, se pregătește un raport final care conține informații privind *substanța de testat*, *specia de testare* și *condițiile de testare*, astfel cum sunt enumerate la punctul 81 (precum pentru metoda expunerii prin apă). Suplimentar, se solicită următoarele informații:

⁽¹⁾ Această abordare este specifică studiului prin alimentație, distinct de procedura urmată în expunerea prin apă, prin urmare, a fost utilizat cuvântul „corecție” mai degrabă decât „normalizare”, pentru a evita orice confuzie – a se vedea, de asemenea, nota de subsol de la paragraful 106.

⁽²⁾ Se poate efectua un test t asupra constantelor de viteză de creștere pentru a verifica dacă creșterea diferă între grupul de testare și cel martor sau un test F în cazul analizei de varianță. În cazul în care este necesar, un test F sau un test al raportului de probabilitate poate fi utilizat pentru a contribui la alegerea modelului de creștere adecvat [monografia 54, OCDE (32)].

Substanța de testat:

- Orice informații privind stabilitatea substanței de testat în hrană preparată;

Condiții de testare:

- Concentrația nominală a substanței în alimente, tehnica de îmbogățire, cantitatea de vehicul (lipidă) utilizată în procesul de îmbogățire (dacă este utilizat), măsurătorile concentrației de substanță de testat în hrană îmbogățită pentru fiecare analiză (în cel puțin trei exemplare înainte de începutul studiului și la sfârșitul absorbției) și valorile medii obținute;
- În cazul în care se utilizează, tipul și calitatea uleiului purtător sau solvent (clasa, furnizorul etc.), utilizat pentru îmbogățirea alimentelor;
- Tipul de alimente utilizate (analiza proximă ⁽¹⁾, clasa sau calitatea, furnizorul etc.), rata de alimentare în timpul fazei de absorbție, cantitatea de hrană administrată și frecvența (inclusiv orice modificări bazate pe greutatea peștilor eșantionați);
- Ora la care peștii au fost colectați și eutanasiați pentru analiză chimică pentru fiecare punct de eșantionare (de exemplu, o oră înainte de hrănirea din următoarea zi);

Rezultate:

- Rezultate din orice alte activități efectuate înainte de studiu;
- Informații cu privire la orice efecte adverse observate;
- Descrierea completă a tuturor procedurilor utilizate, inclusiv limitele de detecție și cuantificare, variabilitatea și recuperarea;
- Concentrațiile măsurate de lipide din hrană (îmbogățită și alimentația martor), valorile medii individuale și deviațiile standard;
- Prezentarea sub formă de tabel a datelor cu privire la greutatea (și lungimea) peștilor, asociate cu fiecare pește, atât pentru grupul martor, cât și pentru grupul de expunere (de exemplu, utilizând identificatori unici pentru fiecare pește) și a calculelor, constanta (constantele) de viteză de creștere derivată(e) și intervalul (intervalele) de încredere de 95 %;
- Date prezentate sub formă de tabel cu privire la concentrația substanței de testat în pești, concentrația medie măsurată la sfârșitul absorbției ($C_{0,m}$) și constanta de viteză de eliminare (totală) derivată (k_2) și concentrația în pește la începutul fazei de eliminare ($C_{0,e}$), împreună cu varianțele în aceste valori (pantă și ordonata la origine);
- Date prezentate sub formă de tabel cu privire la conținutul lipidic în pești (listat în funcție de concentrații specifice substanței, dacă este cazul), valorile medii pentru grupul de testat și grupul martor la începutul testului, la finalul absorbției și la finalul eliminării;
- Curbele (inclusiv toate măsurătorile efectuate), evidențiind următoarele elemente (dacă este cazul, concentrațiile pot fi exprimate în raport cu întregul corp al animalului sau cu țesuturi specifice ale acestora):
 - creșterea [și anume, greutatea (și lungimea) peștilor în funcție de timp] sau logaritmul natural de greutate transformată în funcție de timp;
 - eliminarea substanței de testat din pești; și
 - logaritmul natural de concentrație transformată ($\ln$ concentrație) în funcție de timpul de eliminare (inclusiv constanta de viteză de eliminare derivată k_2 și logaritmul natural de concentrație derivată în pești la începutul fazei de eliminare, $C_{0,e}$).
- În cazul în care o inspecție vizuală a reprezentării grafice demonstrează aberante extreme, se poate aplica un test de detectare a valorilor aberante valid din punct de vedere statistic pentru a elimina punctele de date false, precum și o justificare documentată pentru omiterea acestora.

⁽¹⁾ O tehnică de analiză a alimentației pentru determinarea conținutului de proteine, lipide, fibră și cenușă brută; aceste informații sunt disponibile, de regulă, de la furnizorul alimentar.

- Constanta de viteză de eliminare corectată pentru creștere și timpul de înjumătățire corectat pentru creștere calculate.
- Eficacitatea de asimilare calculată (α).
- BMF alimentară „brut”, BMF cinetică corectat pentru diluția lipidică și de creștere („brut” și corectat pentru lipide pe baza greutateii umede de pește întreg), BMF specific țesuturilor, dacă este cazul.
- Orice informații privind metabolismul substanței de testat marcată radioactiv și acumularea acestora.
- Toate situațiile neobișnuite legate de test, orice deviere de la procedurile respective și orice alte informații relevante.
- Un tabel recapitulativ al datelor relevante măsurate și calculate, după cum urmează:

Constantele de viteză de eliminare și factorii de bioamplificare (BMF_K) ai substanței	
k_c (constanta de viteză de creștere; $ziua^{-1}$):	A se introduce valoarea (95 % CI) ⁽¹⁾
k_2 (constanta de viteză de eliminare totală; $ziua^{-1}$):	A se introduce valoarea (95 % CI)
k_{2c} (constanta de viteză de eliminare corectată de creștere; $ziua^{-1}$):	A se introduce valoarea (95 % CI) ⁽¹⁾
$C_{0,m}$ (concentrația măsurată la timpul zero, concentrația în pește la sfârșitul absorbției ($\mu g/g$):	A se introduce valoarea $\pm$ DS ⁽²⁾
$C_{0,e}$ (concentrația la timpul zero derivată a fazei de eliminare; $\mu g/g$):	A se introduce valoarea $\pm$ DS ⁽²⁾
I (rata de ingestie a alimentației stabilite; g alimentație/ g pește/zi):	A se introduce valoarea
I_c (rația alimentară efectivă, ajustată pentru creștere; g alimentație/g pește/zi) ⁽²⁾ :	A se introduce valoarea $\pm$ DS ⁽²⁾
$C_{hrană}$ (concentrația chimică în hrană; $\mu g/g$):	A se introduce valoarea $\pm$ DS ⁽²⁾
α (eficacitatea de asimilare a substanței):	A se introduce valoarea $\pm$ DS ⁽²⁾
BMF_K (BMF cinetică alimentară):	A se introduce valoarea (95 % CI) ⁽¹⁾
BMF_{Kc} (BMF cinetică alimentară corectat pentru creștere):	A se introduce valoarea (95 % CI) ⁽¹⁾
$t_{1/2c}$ (timpul de înjumătățire corectat pentru creștere în zilele):	A se introduce valoarea $\pm$ DS ⁽²⁾
Lc (factor de corecție lipidică):	A se introduce valoarea
BMF_{KcL} (BMF cinetică corectat pentru creștere corectat lipidic):	A se introduce valoarea
BMF_{SS-L} (BMF orientativ în starea staționară corectat lipidic) ⁽²⁾ :	A se introduce valoarea $\pm$ DS ⁽²⁾

⁽¹⁾ CI: intervalul de încredere (dacă se poate estima)

⁽²⁾ DS: Deviația standard (dacă se poate estima)

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) Chapter C.13 of this Annex, *Bioconcentration: Flow-through Fish Test*.
- (2) Chapter A.6 of this Annex, *Water Solubility*
- (3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. *Environ Toxicol Chem* 12: 2031-2035
- (4) Chapter A.8 of this Annex, *Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method*.
- (5) Chapter A.24 of this Annex, *Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method*.
- (6) Chapter A.23 of this Annex, *Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method*.
- (7) Chapter C.7 of this Annex, *Hydrolysis as a Function of pH*.
- (8) OECD (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- (9) Chapter A.5 of this Annex, *Surface Tension of Aqueous Solutions*.
- (10) Chapter A.4 of this Annex, *Vapour Pressure*.
- (11) Chapter C.4 of this Annex, *Ready Biodegradability*.
- (12) Chapter C.29 of this Annex, *Ready Biodegradability – CO₂ in sealed vessels*
- (13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 102: 117-156.
- (14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.
- (15) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
- (16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klammer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4097-4102.
- (17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelleted fish food. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2058-2062.
- (18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2', 5,5'-tetrachlorobiphenyl. *Toxicol. Sci.* 77: 206-218.
- (19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4: 139-155.
- (20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2436-2448.
- (21) Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. *Environmental Sciences Europe* 2012, 24:13. published: 3 Aprilie 2012.

- (22) Chapter C.47 of this Annex, *Fish, Early-Life Stage Toxicity Test*.
- (23) Chapter C.15 of this Annex, *Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages*
- (24) Chapter C.14 of this Annex, *Fish, Juvenile Growth Test*.
- (25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- (26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.
- (27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.
- (28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA
- (29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- (30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. *Limnol. Oceanogr.* 30: 1099-1105.
- (31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst.* 124: 1711-1718.
- (32) OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- (33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271-2280.
- (34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.
- (35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
- (36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.
- (37) Fisk A.T., Cymbalisky C.D., Bergman Å. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C₁₂- and C₁₆-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1775-1782.
- (38) Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study – Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (39) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijnenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, *Toxicol. Environ. Chem.* 7: 173-189.
- (41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. *Chemosphere.* 14: 829-833.

- (42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699707.
- (43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. Toxicol. Sci. 77: 219-229.
- (44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.
- (45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29: 2769-2777.
- (46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.
- (47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. Environ. Toxicol. Chem. 17: 951-961.
- (48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2503-2517.
- (49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.
- (50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718-1728.
- (51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I – Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II – Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO (2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
-

Apendicele 1

DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Eficacitatea asimilării (α) este o măsură a cantității relative de substanță absorbită din intestine în organism (α este fără unități, însă acesta este exprimată adesea ca un procent mai degrabă decât ca un raport).

Bioacumularea este cunoscută în general ca un proces în care concentrația substanței într-un organism atinge un nivel care depășește nivelul în mediul respirator (de exemplu, apa pentru un pește sau aerul pentru un mamifer), în alimentație sau în ambele (1).

Bioconcentrarea este creșterea în concentrație a substanței de testat într-un sau la un organism (sau țesuturile specifice ale acestuia) în raport cu concentrația substanței de testat în mediul ambiant.

Factorul de bioconcentrare (BCF sau K_b) la orice moment în timpul fazei de absorbție a acestui test de acumulare este concentrația substanței de testat în/la pești sau țesuturile specifice ale acestora (C_p în mg/kg) împărțită la concentrația substanței în mediul ambiant (C_a în mg/l). BCF este exprimat în $l \cdot kg^{-1}$. Se remarcă faptul că nu sunt luate în considerare corecțiile pentru creștere și/sau un conținut lipidic standard.

Bioamplificarea este creșterea în concentrație a substanței de testat în sau la un organism (sau țesuturile specifice ale acestuia) în raport cu concentrația substanței de testat în hrană.

Factorul de bioamplificare (BMF) este concentrația unei substanțe de testat într-un prădător în raport cu concentrația în pradă (sau hrana) prădătorului în starea staționară. În metoda descrisă în prezenta metodă de testare, se evită cu precauție expunerea prin faza apoasă și, prin urmare, o valoare BMF din această metodă de testare nu poate fi comparată în mod direct cu o valoare BMF din cadrul unui studiu de teren (în care atât expunerea prin apă, cât și prin alimentație pot fi combinate).

Factorul de bioamplificare alimentară (BMF alimentară) este termenul utilizat în prezenta metodă de testare pentru a descrie rezultatul testului de expunere prin alimentație în care expunerea prin faza apoasă este evitată cu prudență și, prin urmare, BMF alimentară din această metodă de testare nu poate fi comparat în mod direct cu o valoare BMF din cadrul unui studiu de teren (în care atât expunerea prin apă, cât și cea prin alimentație pot fi combinate).

Faza de post-expunere sau de eliminare (pierdere) este perioada, în urma transferului peștilor dintr-un mediu care conține substanța de testat într-un mediu care nu conține substanța respectivă, în care se studiază eliminarea (sau pierderea netă) de substanță din peștii de testat (sau din țesuturile specifice).

Constanta de viteză de eliminare (pierdere) (k_2) este valoare numerică ce definește viteza de scădere a concentrației substanței de testat în peștii de testat (sau în țesuturile specifice ale acestora) ca urmare a transferării lor dintr-un mediu care conține substanța de testat într-un mediu care nu conține substanța respectivă (k_2 este exprimată în $ziua^{-1}$).

Carbonul organic dizolvat (COD) este o măsură a concentrației de carbon provenit din surse organice dizolvate în mediile de testare.

Faza de expunere sau de absorbție este perioada în care peștii sunt expuși la substanța de testat.

Constanta de viteză de ingestie (I) este cantitatea medie de hrană consumată de fiecare pește în fiecare zi în raport cu media estimată de greutate corporală totală de pește (exprimată în g hrană /g de pește/zi).

Factorul de bioconcentrare cinetică (BCF_k) reprezintă raportul dintre constanta vitezei de absorbție, k_1 , și constanta de viteză de eliminare k_2 (și anume, k_1/k_2 – a se vedea definițiile din prezentul apendice). În principiu, valoarea este comparabilă cu BCF_{ss} (a se vedea definiția mai sus), dar pot apărea deviații în cazul în care starea staționară este incertă sau în cazul în care au fost aplicate corecții de creștere la BCF cinetică.

Factorul de bioconcentrare cinetică normalizată lipidic (BCF_{KL}) este normalizat la un pește cu conținut lipidic de 5 %.

Factorul de bioconcentrare cinetică corectat de creștere normalizat lipidic (BCF_{KCL}) este normalizat la un pește cu un conținut lipidic de 5 % și corectat pentru creștere în timpul perioadei de studiu, astfel cum este descris în apendicele 5.

Factorul de bioconcentrare în stare staționară normalizat lipidic (BCF_{SSL}) este normalizat la un pește cu conținut lipidic de 5 %.

O substanță multicomponentă este definită în scopul REACH ca o substanță care are mai mult de un singur component principal prezent într-o concentrație între 10 % și 80 % (g/g).

Coeficientul de partiție octanol-apă (K_{OW}): raportul de solubilitate al unei substanțe în *n*-ctanol și apă, la echilibru [metodele A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)]; de asemenea, desemnat prin P_{OW} . Logaritmul lui K_{OW} indică potențialul de bioconcentrare al unei substanțe în organismele acvatice.

Carbonul organic sub formă de particule (COP) este o măsură a concentrației de carbon provenit din surse organice în suspensie în mediul de testare.

Microextracție în fază solidă (SPME) este o tehnică analitică fără solvent elaborată pentru sistemele de diluare. În această metodă, o fibră acoperită cu polimer este expusă la faza gazoasă sau lichidă, conținând analitul de interes. În general, se impune un timp minim de analiză, astfel încât să se stabilească condiții de echilibru între fazele solide și lichide în ceea ce privește speciile măsurate. Ulterior, se poate determina concentrația analitului de interes direct din fibră sau după extragerea acestuia din fibră într-un solvent, în funcție de tehnica de determinare.

Se ajunge la o stare staționară în reprezentarea grafică a substanței de testat în pești (C_p) în funcție de timp atunci când curba devine paralelă cu axa timpului și trei analize succesive ale C_p efectuate pe eșantioane prelevate la intervale de cel puțin două zile se încadrează în limita de ± 20 % a fiecăreia și nu există nicio creștere semnificativă a C_p în timp în perioada dintre prima și ultima analiză succesivă. Atunci când se analizează eșantioane reunite, sunt necesare minimum patru analize succesive. În cazul substanțelor experimentale cu caracteristici de absorbție lente, este preferabil să se opteze pentru intervale de șapte zile.

Factorul de bioconcentrare în stare staționară (BCF_{SS}) nu se modifică în mod semnificativ în cursul unei perioade de timp prelungite, concentrația substanței de testat din mediul ambiant fiind constantă pe parcursul acestei perioade de timp (a se vedea definiția stării staționare).

Carbonul organic total (COT) este o măsură a concentrației de carbon organic provenit din toate sursele organice din mediul de testare, inclusiv din surse sub formă de particule sau dizolvate.

Constanta de viteză de absorbție (k_1) este valoarea numerică ce definește viteza de creștere a concentrației substanței de testat la/în pești (sau în țesuturile specifice ale acestora) atunci când peștii sunt expuși la substanță respectivă (k_1 este exprimată în $l\ kg^{-1}\ ziua^{-1}$).

Substanțele cu compoziție necunoscută sau variabilă, produșii de reacție complexă sau materiale biologice sunt cunoscute ca UVCB.

Substanța chimică este o substanță sau un amestec.

Substanța chimică de testat este orice substanță sau amestec care se testează utilizând această metodă de testare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624637.

- (2) . Capitolul A.8 din prezenta anexă, *Coeficientul de partiție (n-octanol/apă): Metoda agitării flaconului*
 - (3) Capitolul A.24 din prezenta anexă, *Coeficientul de partiție (n-octanol/apă), metoda HPLC.*
 - (4) Capitolul A.23 din prezenta anexă, *Coeficientul de partiție (1Octanol/Apă): Metoda agitării lente.*
-

Apendicele 2

UNELE CARACTERISTICI CHIMICE ALE UNEI APE DE DILUȚIE DE NIVEL ACCEPTABIL

Componentă	Concentrația limită
Materie sub formă de particule	5 mg/l
Carbon organic total	2 mg/l
Amoniac neionizat	1 µg/l
Clor rezidual	10 µg/l
Pesticide organofosforice totale	50 ng/l
Pesticide organofluorurate totale plus policlorobifenili	50 ng/l
Clor organic total	25 ng/l
Aluminiu	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Crom	1 µg/l
Cobalt	1 µg/l
Cupru	1 µg/l
Fier	1 µg/l
Plumb	1 µg/l
Nichel	1 µg/l
Zinc	1 µg/l
Cadmiu	100 ng/l
Mercur	100 ng/l
Argint	100 ng/l

Apendicele 3

SPECII DE PEȘTI RECOMANDATE PENTRU TESTARE

Specii recomandate	Intervalul de temperatură recomandat pentru testare (°C)	Lungimea totală recomandată a animalului de experiență (cm) ⁽²⁾
<i>Danio rerio</i> ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebra	20 – 25	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque)	20 – 25	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Carp	20 – 25	8,0 ± 4,0 ⁽³⁾
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel) Medaka	20 – 25	4,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy	20 – 25	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque) Biban-soare	20 – 25	5,0 ± 2,0
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) Păstrăv curcubeu	13 – 17	8,0 ± 4,0
<i>Gasterosteus aculeatus</i> (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) Ghidrin țepos	18 – 20	3,0 ± 1,0

⁽¹⁾ Meyer et al.(1)

⁽²⁾ Se remarcă faptul că, în testul propriu-zis, greutatea este preferată ca măsură pentru dimensiune și pentru abaterile constante de viteză de creștere. Cu toate acestea, este recunoscut faptul că lungimea este o măsură mai practică în cazul în care peștii trebuie să fie selectați prin observație la începutul unui experiment (și anume, din populația stoc).

⁽³⁾ Acest interval de lungime este indicată în Metode de testare pentru substanțe chimice noi (Testing Methods for New Chemical Substances) etc. bazat pe legea pentru controlul substanțelor chimice din Japonia (Japan's Chemical Substances Control Law, CSCL).

Diverse specii marine și de estuar au fost utilizate la o scară mai mică, de exemplu:

Spot	(<i>Leiostomus xanthurus</i>)
Sheepshead minnow	(<i>Cyprinodon variegatus</i>)
Silverside	(<i>Menidia beryllina</i>)
Shiner perch	(<i>Cymatogaster aggregata</i>)
English sole	(<i>Parophrys vetulus</i>)
Staghorn sculpin	(<i>Leptocottus armatus</i>)
Ghidrin țepos	(<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
Biban de mare	(<i>Dicentrarchus labrax</i>)
Obleț	(<i>Alburnus alburnus</i>)

Peștii de apă dulce menționați în tabelul de mai sus sunt ușor de crescut și/sau foarte disponibili tot timpul anului față de speciile marine sau de estuar, a căror disponibilitate este, în anumite țări, limitată. Aceștia se reproduc și trăiesc atât în fermele piscicole, cât și în laboratoare, în condiții în care maladiile și paraziții se află sub control, astfel încât animalele utilizate vor fi în stare bună de sănătate, cu ascendență genetică cunoscută. Pot fi găsiți aproape în întreaga lume.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.
-

Apendicele 4

CALENDARE DE EȘANTIOARE PENTRU TESTELE CU EXPUNERE PRIN APĂ ȘI PRIN ALIMENTAȚIE

1. Exemplu teoretic de calendar de eșantionare pentru un test complet de bioconcentrare cu expunere prin apă al unei substanțe cu $\log K_{ow} = 4$.

Eșantionarea peștilor	Calendarul de eșantionare		Nr. de eșantioane de apă ⁽¹⁾	Nr. de pești per eșan- tion ⁽¹⁾
	Frecvența minimă necesară (zile) ⁽²⁾	Eșantionarea supli- mentară (zile) ⁽²⁾		
Faza de absorbție				
1	-1		2 ⁽³⁾	4 ⁽⁴⁾
	0		(2)	(3 ⁽⁶⁾)
2	0,3		2	4
		0,4	(2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	(2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	(2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	(2)	(4)
6	4,7		2	4 – 8 ⁽⁵⁾
				(3 ⁽⁶⁾)
Faza de eliminare				Transferul peștilor în apa fără substanța de testat
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)

Eșantionarea peștilor	Calendarul de eșantionare		Nr. de eșantioane de apă ⁽¹⁾	Nr. de pești per eșantion ⁽¹⁾
	Frecvența minimă necesară (zile) ⁽²⁾	Eșantionarea suplimentară (zile) ⁽²⁾		
Faza de absorbție				
10	14,0		2	4 – 8 ⁽⁵⁾
		17,5		(4+3 ⁽⁶⁾)
TOTAL				40 – 72 (48 – 80) ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Valorile dintre paranteze sunt numerele de eșantioane (apă, pești) care trebuie prelevate, în cazul în care se procedează la o eșantionare suplimentară.

⁽²⁾ Estimarea înaintea testului a lui k_1 pentru un $\log K_{OW}$ de 4,0 este de $0,652 \text{ zile}^{-1}$. Durata totală a experimentului este fixată la $3 \times t_{SS} = 3 \times 4,6$ zile, și anume, 14 zile. Pentru estimarea t_{SS} , a se vedea apendicele 5.

⁽³⁾ Se eșantionează apa după ce au fost livrate un minim de 3 „volume ale camerei”.

⁽⁴⁾ Acești pești sunt eșantionați din populația stoc.

⁽⁵⁾ În cazul în care este necesară o precizie mai mare sau studii de metabolism care necesită un număr mai mare de pești, aceștia se eșantionează în special la finalul fazelor de absorbție și de eliminare (a se vedea punctul 40).

⁽⁶⁾ Pot fi necesari cel puțin 3 pești suplimentari pentru analiza conținutului lipidic în cazul în care nu este posibil să se utilizeze aceiași pești eșantionați pentru concentrațiile de substanță la începutul testului, la finalul fazei de absorbție și la finalul fazei de eliminare. NOTĂ: este posibil ca în multe cazuri să se utilizeze numai cei 3 pești martor (a se vedea punctul 56).

2. Exemplu teoretic de calendar de eșantionare pentru testul de bioacumulare prin alimentație al substanței în urma fazei de absorbție de 10 zile și fazei de eliminare de 42 de zile.

Eșantionarea	Calendarul de eșantionare		Nr. de eșantioane de hrană	Nr. de pești per eșantion	
	Ziua din fază	Eșantioane de pește suplimentare?		Grup de testat	Grupul martor
Faza de absorbție					
1	0	Posibil ⁽¹⁾ ⁽²⁾	3 – group de testat	0	5 – 10
			3 – group martor ⁽¹⁾		(8 – 13) ⁽²⁾
1A ⁽³⁾	1-3			5 – 10	5 – 10
2	10	Da ⁽⁴⁾	3 – group de testat	10 – 15 ⁽⁴⁾	5 – 10
			3 – group martor ⁽¹⁾	(13 – 18) ⁽⁵⁾	(8 – 13) ⁽⁵⁾
Faza de eliminare					
3	1	Da ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾	5 – 10
4	2			5 – 10	5 – 10
5	4			5 – 10	5 – 10

Eșantionarea	Calendarul de eșantionare		Nr. de eșantioane de hrană	Nr. de pești per eșantion	
	Ziua din fază	Eșantioane de pește suplimentare?		Grup de testat	Grupul martor
Faza de absorbție					
6	7	Da ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾	5 – 10
7	14			5 – 10	5 – 10
8	28			5 – 10	5 – 10
9	42	Da ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾ (13 – 18) ⁽⁵⁾	5 – 10 (8 – 13) ⁽⁵⁾
TOTAL				59 – 120 (63 – 126) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾	50 – 110 (56 – 116) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ 3 eșantioane de hrană atât din grupul martor, cât și din grupul de testat, analizate pentru concentrația substanței de testat și conținutul lipidic.

⁽²⁾ Peștii sunt eșantionați din populația stoc cât mai aproape posibil de începutul studiului; cel puțin 3 pești din populația stoc la începutul testului se eșantionează pentru conținutul lipidic.

⁽³⁾ Eșantionarea (opțională) la începutul fazei de absorbție furnizează date pentru a calcula asimilarea alimentară a substanței de testat ce pot fi comparate cu eficacitatea asimilării calculată din datele fazei de eliminare

⁽⁴⁾ 5 pești suplimentari pot fi eșantionați pentru analiza specifică țesutului.

⁽⁵⁾ Pot fi necesari cel puțin 3 pești suplimentari pentru analiza conținutului lipidic în cazul în care nu este posibil să se utilizeze aceiași pești eșantionați pentru concentrațiile de substanță la începutul testului, la finalul fazei de absorbție și la finalul fazei de eliminare. NOTĂ: Este posibil ca în multe cazuri să se utilizeze numai cei 3 pești martor (a se vedea punctele 56 și 153).

Notă cu privire la calendarele fazelor și ale eșantionărilor: Faza de absorbție începe cu prima alimentație cu hrană îmbogățită. O zi experimentală durează de la o alimentație până cu puțin timp înainte de următoarea, 24 de ore mai târziu. Prima eșantionare (1 în tabel) se efectuează la puțin timp înainte de prima alimentație (de exemplu, o oră). Eșantionarea în timpul unui studiu se efectuează cu puțin timp înainte de alimentația următoarei zile (și anume, aproximativ 23 de ore după alimentația zilei de eșantionare). Faza de absorbție se încheie cu puțin timp înaintea de prima alimentație cu hrană neîmbogățită, când începe faza de eliminare (peștii din grupul de testat sunt susceptibili să digere încă hrana îmbogățită în intervalul de 24 de ore după ultima alimentație cu hrană îmbogățită). Acest lucru înseamnă că eșantionul de la sfârșitul absorbției se prelevează cu puțin timp înainte de prima alimentație cu hrană neîmbogățită și primul eșantion din faza de eliminare se prelevează cu aproximativ 23 de ore după prima hrănire cu alimentație neîmbogățită.

Apendicele 5

CALCULE GENERALE

1. Introducere
2. Estimarea duratei fazei de absorbție
3. Estimarea duratei fazei de eliminare
4. Metodă secvențială: determinarea constantei de viteză de eliminare (pierdere) k_2
5. Metodă secvențială: determinarea constantei de viteză de absorbție k_1 (numai pentru metoda expunerii prin apă)
6. Metoda simultană pentru a calcula constantele de viteză de absorbție și de eliminare (pierdere) (numai pentru metoda expunerii prin apă)
7. Corecția de diluție de creștere pentru BCF și BMF cinetică
8. Normalizare lipidică la 5 % conținut lipidic (numai pentru metoda expunerii prin apă)

1. INTRODUCERE

Modelul general de bioacumulare acvatică în pești poate fi descris în ceea ce privește procesele de absorbție și de eliminare, ignorând absorbția alimentelor. Ecuația diferențială (dC_p/dt) care prezintă rata fluctuației concentrației în pești ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{ziua}^{-1}$) este dată de (1):

$$\frac{dC_p}{dt} = k_1 \times C_a - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_p \quad [\text{Ecuația A5.1}]$$

Unde

- k_1 = Constanta de viteză de ordinul întâi pentru absorbția în pește ($\text{l}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{ziua}^{-1}$).
 k_2 = Constanta de viteză de ordinul întâi pentru eliminarea din pește (ziua^{-1}).
 k_g = Constanta de viteză de ordinul întâi pentru creșterea peștilor („diluția de creștere”) (ziua^{-1})
 k_m = Constanta de viteză de ordinul întâi pentru transformarea metabolică (ziua^{-1})
 k_e = Constanta de viteză de ordinul întâi pentru egestia materiilor fecale (ziua^{-1})
 C_a = Concentrația în apă ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).
 C_p = Concentrația în pește ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ greutate umedă).

Pentru substanțele bioacumulative, se poate preconiza că o medie ponderată de timp (MPT) este concentrația de expunere cea mai relevantă în apă (C_a), în intervalul admis de fluctuație (a se vedea punctul 24). Se recomandă calcularea unei MPT a concentrației apei în conformitate cu procedura descrisă în apendicele 6 a metodei de testare C.20 (2). Se remarcă faptul că transformarea în a concentrației apei este adecvată atunci când se preconizează dezintegrarea exponențială între perioadele de reînnoire, de exemplu într-un model de testare în regim semistatic. Într-un sistem dinamic, transformarea în a concentrațiilor de expunere poate să nu fie necesară. În cazul în care se obțin MPT ale concentrațiilor apei, acestea se raportează și se utilizează în calculele ulterioare.

Într-un test standard al BCF la pești, absorbția și eliminarea pot fi descrise în ceea ce privește două procese cinetice de ordinul întâi.

$$\text{Rata de absorbție} = k_1 \times C_a \quad [\text{Ecuația A5.2}]$$

$$\text{Rata de eliminare totală} = (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_p \quad [\text{Ecuația A5.3}]$$

În starea staționară, presupunând că metabolismul și creșterea sunt neglijabile (și anume, valorile k_c și k_m nu pot fi diferențiate de zero), rata de absorbție este egală cu rata de eliminare și, prin urmare, combinarea ecuației A5.2 și a ecuației A5.3 furnizează următoarea relație:

$$BCF = \frac{C_{p-ss}}{C_{a-ss}} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{Ecuația A5.4}]$$

Unde

C_{p-ss} = Concentrația în pește în starea staționară (mg kg^{-1} greutate umedă).

C_{a-ss} = Concentrația în apă în starea staționară (mg l^{-1}).

Raportul dintre k_1/k_2 este cunoscut ca BCFcinetică (BCF_k) și este egal cu BCF în starea staționară (BCF_{ss}) obținută din raportul dintre concentrația în starea staționară în pești și cea în apă, dar pot să apară abateri în cazul în care starea staționară a fost incertă sau în cazul în care au fost aplicate corecții de creștere BCF cinetică. Cu toate acestea, având în vedere faptul că k_1 și k_2 sunt constante, nu este necesară atingerea stării staționare pentru a obține BCF_k .

Pe baza acestor ecuații de ordin întâi, prezentul apendice 5 include calculele generale necesare pentru metodele de bioacumulare cu expunere atât prin apă, cât și prin alimentație. Cu toate acestea, punctele 5, 6 și 8 sunt relevante numai pentru metoda expunerii prin apă, dar sunt incluse aici deoarece acestea sunt tehnici „generale”. Metodele secvențiale (punctele 4 și 5) și simultane (punctul 6) permit calcularea constantelor de absorbție și de eliminare care sunt utilizate pentru a determina BCF cinetice. Metodă secvențială pentru a determina k_2 (punctul 4) este importantă pentru metoda alimentară întrucât aceasta este necesară pentru a calcula atât eficacitatea asimilării, cât și BMF. Apendicele 7 prezintă în detaliu calculele care sunt specifice pentru metoda alimentară.

2. ESTIMAREA DURATEI FAZEI DE ABSORBȚIE

Înainte de efectuarea testului, se poate estima k_2 și, prin urmare, un procentaj de timp necesar pentru a ajunge la starea staționară, pornind de la relațiile empirice între k_2 și coeficientul de partiție *n*-octanol/apă (K_{ow}) sau între k_1 și BCF. Se remarcă, cu toate acestea, faptul că ecuațiile de la acest punct se aplică numai atunci când absorbția și eliminarea urmează o cinetică de ordinul întâi. În cazul în care, în mod clar, acest lucru nu este valabil, se recomandă să se solicite consultanță din partea unui biostatistician și/sau a unui specialist în farmacocinetică în cazul în care se doresc estimări pentru faza de absorbție.

O estimare a k_2 (ziua^{-1}) poate fi obținută prin mai multe metode. De exemplu, următoarele relații empirice se pot utiliza în primă instanță ⁽¹⁾:

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \log K_{ow} \quad (r^2=0,95) [(3); \text{Ecuația A5.5}]$$

sau

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF} \quad [\text{Ecuația A5.6}]$$

$$\text{Unde } k_1 = 520 \times W^{-0,32} \text{ (pentru substanțele cu } \log K_{ow} > 3) \quad (r^2 = 0,85) [(4); \text{Ecuația A5.7}]$$

$$\text{Și } BCF = 10^{(0,910 \cdot \log K_{ow} - 1,975 \cdot \log(6,8 \cdot 10^{-7} K_{ow} + 1) - 0,786)} \quad (r^2 = 0,90) [(5); \text{Ecuația A5.8}]$$

⁽¹⁾ Ca în cazul oricărei relații empirice, se verifică dacă substanța de testat se încadrează în domeniul de aplicabilitate a relației

W = greutatea medie a peștelui tratat (grame greutate umedă) la finalul absorbției/începutul eliminării ⁽¹⁾

Pentru alte relații conexe, *a se vedea* (6). Poate fi avantajoasă aplicarea mai multor modele complicate la estimarea k_2 , în cazul în care, de exemplu, este posibil să se producă o metabolizare semnificativă (7) (8). Cu toate acestea, pe măsură ce complexitatea modelului crește, se acordă o atenție mai mare la interpretarea estimărilor. De exemplu, prezența de grupe nitro ar putea indica o metabolizare rapidă, dar acest lucru nu se întâmplă întotdeauna. Prin urmare, utilizatorul trebuie să pună în balanță rezultatele metodei estimative în raport cu structura chimică și orice alte informații relevante (de exemplu, studii preliminare) în ceea ce privește programarea unui studiu.

Timpul necesar pentru atingerea unui anumit procentaj de stare staționară poate fi obținut prin aplicarea estimării k_2 din ecuația cinetică generală ilustrând absorbția și eliminarea (cinetica de ordinul întâi), presupunând o creștere și un metabolism neglijabile. În cazul în care are loc o creștere substanțială în cursul studiului, estimările descrise mai jos nu vor fi considerate fiabile. În astfel de cazuri, este mai bine să se utilizeze k_{2c} corectat pentru creștere, astfel cum este descris în continuare (a se vedea punctul 7 din prezentul apendice):

$$\frac{dC_p}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_f \quad [\text{Ecuația A5.9}]$$

Sau, dacă C_a este constantă:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Ecuația A5.10}]$$

Atunci când se apropie de starea staționară ($t \rightarrow \infty$), ecuația A5.10 se poate reduce (a se vedea (9)(10)) la:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad [\text{Ecuația A5.11}]$$

sau

$$\frac{C_p}{C_a} = \frac{K_1}{K_2} = BCF \quad [\text{Ecuația A5.12}]$$

Ulterior $BCF \times C_a$ este o aproximare la concentrația în pești la starea staționară (C_{p-ss}). [Notă: aceeași abordare poate fi utilizată atunci când se estimează un BMF la stare staționară cu un test alimentar. În acest caz, BCF se înlocuiește cu BMF și C_a cu $C_{\text{hrană}}$, concentrația în hrană, în ecuațiile de mai sus]

Ecuația A5. 10 poate fi transcrisă la:

$$C_p = C_{p-ss} (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Ecuația A5.13}]$$

sau

$$\frac{C_p}{C_{p-ss}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{Ecuația A5.14}]$$

Prin aplicarea ecuației A5.14, timpul necesar pentru atingerea unui anumit procentaj din starea staționară poate fi estimat atunci când k_2 a fost estimat în prealabil utilizând ecuația A5.5 sau cu ecuația A5.6.

Ca orientare, durata optimă statistică a fazei de absorbție pentru producerea de date statistice acceptabile (BCF_k) este perioada necesară pentru ca respectiva curbă a logaritmului concentrației de substanță de testat în pești raportată în funcție de timp liniar să atingă cel puțin 50 % din starea staționară (și anume, $0,69/k_2$), dar nu mai mult de 95 % din starea staționară (și anume, $3,0/k_2$) (11). În cazul în care acumularea depășește 95 % din starea staționară, calcularea unui BCF_{ss} devine fezabilă.

⁽¹⁾ Greutatea peștelui la finalul fazei de absorbție poate fi estimată din datele din studiile anterioare sau cunoștințele cu privire la susceptibilitatea speciilor de testat la creșterea în mărime dintr-un test tipic inițial de greutate pe o durată tipică de absorbție (de exemplu, 28 de zile).

Timpul necesar pentru a atinge 80 % din starea staționară este (utilizând ecuația A5.14):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{Ecuația A5.15}]$$

sau

$$t_{80} = \frac{-\ln(0,20)}{k_2} = \frac{1,6}{k_2} \quad [\text{Ecuația A5.16}]$$

În mod similar, timpul necesar pentru a atinge 95 % din starea staționară este:

$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2} \quad [\text{Ecuația A5.17}]$$

De exemplu, durata fazei de absorbție (și anume, timpul necesar pentru atingerea unui anumit procentaj din starea staționară, de exemplu, t_{80} sau t_{95}) pentru o substanță de testat cu $\log K_{OW} = 4$ ar fi (utilizând ecuația A5.5, ecuația A5.16 și ecuația A5.17):

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0,652 \text{ ziua}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1,6}{0,652} = 2,45 \text{ zile (59 ore)}$$

$$\text{sau } t_{95} = \frac{3,0}{0,652} = 4,60 \text{ zile (110 ore)}$$

De asemenea, expresia alternativă:

$$t_{ess} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55,31 \text{ (ore)} \quad [\text{Ecuația A5.18}]$$

se poate utiliza pentru a calcula timpul pentru a atinge starea staționară eficientă (t_{ess}) (12). În cazul unei substanțe de testat cu $\log K_{OW} = 4$, aceasta are ca rezultat:

$$t_{ess} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55,31 = 121 \text{ hours}$$

3. ESTIMAREA DURATEI FAZEI DE ELIMINARE

Se poate estima, de asemenea, timpul necesar pentru a reduce conținutul corporal la un anumit procentaj din concentrația inițială utilizând ecuația generală care ilustrează absorbția și eliminarea [presupunând cinetica de ordinul întâi, a se vedea ecuația A5.9 (1) (13).]

Pentru faza de eliminare, C_a (sau $C_{hrană}$ pentru testul alimentară) este presupusă a fi zero. Ecuația poate fi redusă ulterior la:

$$\frac{dC_p}{dt} = k_2 C_p \quad [\text{Ecuația A5.19}]$$

sau

$$C_p = C_{p,0} \cdot e^{-k_2 t} \quad [\text{Ecuația A5.20}]$$

unde $C_{p,0}$ este concentrația la începutul perioadei de eliminare.

50 la sută eliminare va fi atinsă la momentul (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

sau

$$t_{50} = \frac{-\ln(0,50)}{k_2} = \frac{0,693}{k_2}$$

În mod similar, 95 la sută eliminare va fi atinsă la:

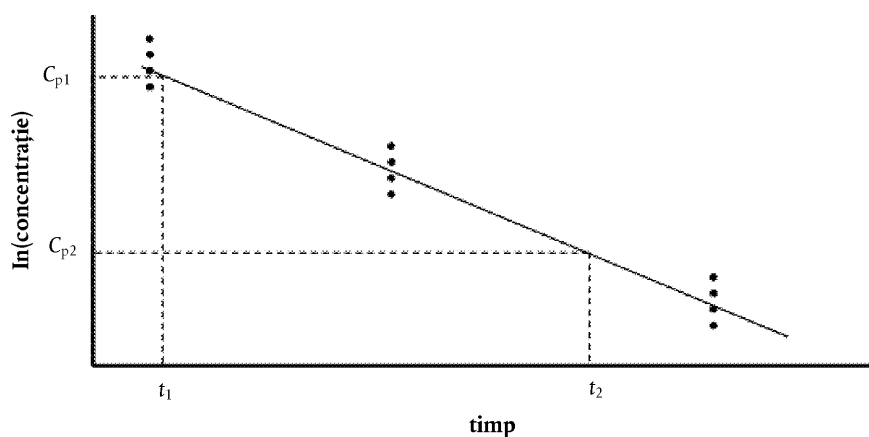
$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2}$$

În cazul în care se utilizează o rată de absorbție de 80 % pentru prima perioadă ($1,6/k_2$) și 95 % pierderi pentru faza de eliminare ($3,0/k_2$), atunci faza de eliminare este aproximativ dublul duratei fazei de absorbție.

Se remarcă faptul că aceste estimări se bazează pe ipoteza că schemele de absorbție și eliminare urmează o cinetică de ordinul întâi. În cazul în care se constată că în mod clar nu a fost urmată o cinetică de ordinul întâi, aceste estimări nu sunt valabile.

4. METODĂ SECVENȚIALĂ: DETERMINAREA CONSTANTEI DE VITEZĂ DE ELIMINARE (PIERDERE) K_2

Se presupune că majoritatea datelor de bioconcentrare sunt „rezonabil” de bine descrise printr-un model simplu cu două compartimente/doi parametri, respectiv printr-o curbă rectilinie ce reprezintă aproximativ punctele de măsură a concentrațiilor în pești (pe o scară ln), în cursul fazei de eliminare.



Se remarcă faptul că abaterile de la această linie dreaptă pot indica o schemă de eliminare mai complexă decât cinetica de ordinul întâi. Se poate aplica o metodă grafică pentru a rezolva aceste tipuri de eliminare care se abat de la cinetica de ordinul întâi.

Pentru a calcula k_2 pentru mai multe puncte de timp (eșantionare), se efectuează o regresie liniară a ln (concentrație) în funcție de timp. Panta liniei de regresie este o estimare a constantei de viteză de eliminare k_2 ⁽¹⁾. Pentru ordonata la origine, concentrația medie în pești la începutul fazei de eliminare ($C_{0,e}$; care este echivalentă cu concentrația medie în pești la finalul fazei de absorbție) poate fi calculată cu ușurință (incluzând marje de eroare) ⁽¹⁾:

$$C_{0,d} = e^{\text{intercept}}$$

[Ecuția A5.21]

⁽¹⁾ În majoritatea programelor care permit o regresie liniară, se furnizează, de asemenea, erori standard și intervale de încredere (CI) pentru estimări, de exemplu, în Microsoft Excel, setul de instrumente de analiză a datelor.

Pentru a calcula k_2 atunci când au sunt disponibile numai două puncte de timp (eșantionare) (precum în modelul minimizat), se înlocuiesc cele două concentrații medii în următoarea ecuație

$$k_2 = \frac{\ln(C_{p1}) - \ln(C_{p2})}{t_2 - t_1} \quad [\text{Ecuația A5.22}]$$

Unde $\ln(C_{p1})$ și $\ln(C_{p2})$ sunt logaritmi naturali ai concentrațiilor la momentele t_1 și respectiv t_2 și t_2 și t_1 sunt momentele în care au fost prelevate cele două probe față de începutul eliminării ⁽¹⁾.

5. METODĂ SECVENȚIALĂ: DETERMINAREA CONSTANTEI DE VITEZĂ DE ABSORBȚIE k_1 (NUMAI PENTRU METODA EXPUNERII PRIN APĂ)

În scopul de a afla o valoare pentru k_1 utilizând un ansamblu de date secvențiale ale concentrației în timp pentru faza de absorbție, se utilizează un program pentru calculator care permite următorul model:

$$C_p(t) = C_a(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Ecuația A5.23}]$$

Unde k_2 este furnizată de formula de calcul anterioară, $C_p(t)$ și $C_a(t)$ sunt concentrațiile în pește și respectiv, în apă la momentul t .

Pentru a calcula k_1 atunci când sunt disponibile numai două puncte de timp (eșantionare) (precum în modelul minimizat) se utilizează următoarea formulă:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_a(1 - e^{-k_2 t})} \quad [\text{Ecuația A5.24}]$$

Unde k_2 este furnizat de formula de calcul anterioară, C_p este concentrația în pește la începutul fazei de eliminare și C_a este concentrația medie în apă pe parcursul fazei de absorbție ⁽²⁾.

Inspecția vizuală a pantelor k_1 și k_2 reprezentate în funcție de datele măsurate pentru punctele de eșantionare se poate utiliza pentru a evalua calitatea de ajustare. În cazul în care se dovedește că metoda secvențială a furnizat o estimare slabă pentru k_1 , se aplică abordarea simultană pentru a calcula k_1 și k_2 (a se vedea următoarea secțiune, 6). Din nou, pantele rezultate se compară cu datele măsurate reprezentate grafic pentru inspecția vizuală a calității ajustării. În cazul în care calitatea ajustării este încă slabă, acesta poate fi un indiciu al faptului că cinetica de ordin întâi nu se aplică și trebuie să se utilizeze alte modele mai complexe.

6. METODA SIMULTANĂ PENTRU A CALCULA CONSTANTELE DE VITEZĂ DE ABSORBȚIE ȘI DE ELIMINARE (PIERDERE) (NUMAI PENTRU METODA EXPUNERII PRIN APĂ)

Se pot utiliza programe pentru calculator pentru a identifica valorile pentru k_1 și k_2 utilizând un ansamblu de date secvențiale ale concentrației în timp și modelul:

$$C_p = C_a \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{Ecuația A5.25}]$$

$$C_p = C_a \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad [\text{Ecuația A5.26}]$$

unde

t_c = timpul la finalul fazei de absorbție

⁽¹⁾ Spre deosebire de metoda regresiei liniare, utilizarea acestei metode nu va genera o eroare standard pentru k_2 .

⁽²⁾ Spre deosebire de o procedură de ajustare liniară, această metodă nu va genera, de regulă, o eroare standard sau un interval de încredere pentru k_1 estimat.

Această abordare oferă în mod direct erori standard pentru estimările pentru k_1 și k_2 . Atunci când k_1/k_2 este înlocuit de BCF (a se vedea ecuația A5.4) în ecuația A5.25 și ecuația A5.26, se poate estima, de asemenea, eroarea standard și intervalul de încredere de 95 % al BCF. Acest lucru este util în special atunci când se compară diverse estimări datorită transformării datelor. Variabila dependentă (concentrația în pește) poate fi adaptată cu sau fără transformare $\ln$ și incertitudinea BCF rezultată poate fi evaluată.

Având în vedere corelația puternică între cei doi parametri k_1 și k_2 în cazul în care sunt estimați în mod simultan, se recomandă calcularea mai întâi a k_2 numai din datele de eliminare (a se vedea mai sus); în majoritatea cazurilor k_2 poate fi estimat cu precizie relativ mare din curba de eliminare. k_1 poate fi calculat ulterior din datele de absorbție utilizând regresia neliniară ⁽¹⁾. Se recomandă să se utilizeze aceeași transformare a datelor la ajustarea în mod succesiv.

Se poate utiliza inspecția vizuală a pantelor rezultate atunci când sunt reprezentate grafic în funcție de datele măsurate pentru punctele de eșantionare pentru a evalua calitatea ajustării. În cazul în care se dovedește că această metodă a furnizat o estimare slabă pentru k_1 , se poate aplica abordarea simultană pentru a calcula k_1 și k_2 . Din nou, modelul de ajustare se compară cu datele măsurate grafic pentru inspecția vizuală a calității ajustării și estimările parametrilor rezultate pentru k_1 , k_2 și BCF rezultat și erorile standard și/sau intervale de încredere ale acestora se compară între diferite tipuri de ajustare.

În cazul în care calitatea de ajustare este slabă, aceasta poate fi o indicație a faptului că cinetica de ordin întâi nu se aplică și este necesară utilizarea altor modele mai complexe. Una dintre cele mai frecvente complicații este creșterea peștilor în timpul testului.

7. CORECȚIA DE DILUȚIE DE CREȘTERE PENTRU BCF ȘI BMF CINETICĂ

Acest punct descrie o metodă standard de corecție în urma creșterii peștilor în timpul testului (așa-numita „diluție de creștere”), care este valabilă numai în cazul în care se aplică cinetica de ordinul întâi. În cazul în care există indicii că cinetica de ordinul întâi nu se aplică, se recomandă să se solicite consultanță din partea unui biostatistician pentru o corecție corespunzătoare de diluție de creștere sau să se utilizeze abordarea bazată pe masă descrisă mai jos.

În unele cazuri, această metodă de corectare a diluției de creștere este condiționată de o lipsă de precizie sau uneori nu funcționează (de exemplu, în cazul substanțelor cu eliminare foarte lentă testate în pești care cresc repede, constanta de viteză de eliminare derivată corectată pentru diluția de creștere, k_{2c} , poate fi foarte mică, ceea ce înseamnă că rata de eroare în cele două constante utilizate la obținerea acestora devine critică și, în unele cazuri, estimarea k_c poate fi mai mare decât k_2). În astfel de cazuri, poate fi utilizată o abordare alternativă (și anume, abordarea în masă), care funcționează, de asemenea, în cazul în care cineticile de ordinul întâi de creștere nu au fost respectate, evitându-se necesitatea de corecție. Această abordare este prezentată la sfârșitul prezentului punct.

Metoda de scădere a constantei de viteză de creștere pentru corecția de creștere

Pentru metoda standard, toate datele individuale de greutate și lungime sunt convertite în logaritmi naturali și $\ln$ (greutate) sau $\ln(1/\text{greutate})$ se reprezintă grafic în raport cu timpul (z_i), în mod separat pentru grupul de tratament și grupul martor. Același proces se efectuează pentru datele din fazele de absorbție și de eliminare, în mod separat. În general, pentru corecția diluției de creștere este mai adecvată utilizarea datelor de greutate din întreg studiul pentru a obține constanta de viteză de creștere (k_c), dar diferențele semnificative din punct de vedere statistic între constantele de viteză de creștere obținute pentru faza de absorbție și faza de eliminare pot indica faptul că ar trebui utilizată constanta de viteză a fazei de eliminare. Se pot utiliza ratele totale de creștere din studiile efectuate pe apă pentru grupurile de testare și martor pentru a verifica eventualele efecte legate de tratament.

⁽¹⁾ Trebuie înțeles faptul că incertitudinea în estimare k_2 nu este utilizată în mod corespunzător în modelul de bioacumulare atunci când aceasta este considerată în mod esențial ca fiind constantă la ajustarea k_1 în metoda secvențială de ajustare. Incertitudinea BCF rezultată va fi diferită, prin urmare, între metodele simultane sau secvențiale de ajustare.

Se calculează o corelație liniară a celor mai mici pătrate pentru $\ln(\text{greutatea peștelui})$ pe zi [și pentru $\ln(1/\text{greutate})/\text{zi}$] pentru fiecare grup (de testat și martor, date individuale, valorii medii nu zilnice) pentru întregul studiu, fazele de absorbție și de eliminare utilizând proceduri statistice standard. Se calculează varianțele dintre pantele liniilor și se utilizează pentru a evalua semnificația statistică ($p = 0,05$) a diferenței în pante (constantele de viteză de creștere) prin utilizarea unui test t Student (sau ANOVA, în cazul în care se testează mai mult de o concentrație). Datele privind greutatea sunt preferate, în general, în scopuri de corecție de creștere. Datele cu privire la lungime, tratate în același mod, pot fi utile la realizarea unei comparații între grupurile martor și de testat în ceea ce privește efectele legate de tratament. În cazul în care nu există nicio diferență semnificativă din punct de vedere statistic în analiza datelor cu privire la greutate, se pot reuni datele de testare și martor și se poate calcula o constantă de viteză de creștere totală a peștilor pentru studiu (k_2) ca pantă totală a corelației liniare. În cazul în care se observă diferențe semnificative din punct de vedere statistic, se raportează separat constantele vitezei de creștere pentru fiecare grup de pești și/sau fază de studiu. Se utilizează ulterior constanta de viteză de la fiecare grup în scopuri de corecție de diluție de creștere pentru grupul respectiv. În cazul în care se notează diferențe statistice între constantele de viteză ale fazei de absorbție și de eliminare, se utilizează constante de viteză determinată din faza de eliminare.

Constanta de viteză de creștere calculată (k_c exprimată în ziua^{-1}) poate fi scăzută din constanta de viteză de eliminare totală (k_2) pentru a furniza constanta de viteză de eliminare, k_{2c} .

$$k_{2c} = k_2 - k_c \quad [\text{Ecuția A5.27}]$$

Constanta de viteză de absorbție este împărțită la constanta de viteză de eliminare corectată pentru creștere pentru a furniza BCF cinetică corectat pentru creștere, desemnat BCF_{k_c} (sau BMF_{k_c}).

$$\text{BCF}_{k_g} = \frac{k_1}{k_{2c}} \quad [\text{Ecuția A5.28}]$$

Constanta de viteză de creștere determinată pentru un studiu alimentar este utilizată în ecuația A7.5 pentru calcularea BMF_{k_c} corectat pentru creștere (a se vedea apendicele 7).

Metoda bazată pe masă pentru corecția de creștere

O alternativă la „metoda de scădere a constantei de viteză de creștere” de mai sus care evită necesitatea de a efectua corecții pentru creștere poate fi utilizată după cum urmează. Principiul este de a utiliza datele de eliminare pe o bază de masă pe pește întreg, mai degrabă decât pe baza unei concentrații.

Se convertesc concentrațiile tisulare din faza de eliminare (masa substanței de testat/unitate de masă a peștelui) în masa substanței de testat/pește: se potrivesc concentrațiile și greutatea corporale individuale sub formă de tabel (de exemplu, cu ajutorul unei foi de calcul pe un calculator) și se înmulțește fiecare concentrație cu greutatea totală de pește pentru ca această măsurare să furnizeze un set de mase ale substanței de testat/peștelui pentru toate eșantioanele din faza de eliminare.

Se reprezintă grafic logaritmul natural rezultat ale datelor masei substanței de testat în funcție de timp pentru experiment (faza de eliminare), astfel cum ar fi efectuat în mod normal.

Pentru metoda expunerii prin apă, se obține constanta de viteză de absorbție pentru fiecare zi (a se vedea punctele 4 și 6) (se remarcă faptul că valoarea „normală” k_2 se utilizează în interpolarea ecuațiilor pentru k_1) și se obține constanta de viteză de eliminare pentru datele de mai sus. Deoarece valoarea rezultată pentru constanta de viteză de eliminare este independentă de creștere întrucât a fost determinată pe o bază de masă pe pește întreg, se notează ca k_{2c} și nu k_2 .

8. NORMALIZARE LIPIDICĂ LA 5 % CONȚINUT LIPIDIC (NUMAI PENTRU METODA EXPUNERII PRIN APĂ)

Rezultatele BCF (cinetică și la starea staționară) din studiile de expunere prin apă se raportează, de asemenea, în raport cu conținutul lipidic implicit de 5 % greutate umedă, cu excepția cazului în care se poate argumenta faptul că substanța de testat nu se acumulează în principal în lipide (de exemplu, unele substanțele perfluorinate se pot lega de proteine). Datele cu privire la concentrația peștelui sau BCF trebuie să fie convertite la un conținut lipidic de 5 % pe baza greutății umede. În cazul în care au fost utilizați aceiași pești pentru măsurarea concentrațiilor substanței și a conținutului lipidic la toate punctele de eșantionare, acest lucru necesită corectarea fiecărei concentrații măsurate în pește pentru conținutul lipidic al peștilor respectivi.

$$C_{p,L} = \frac{0,05}{L} \cdot C_p \quad [\text{Ecuția A5.29}]$$

unde

$C_{p,L}$ = concentrația în pește normalizată lipidic (mg kg⁻¹ greutate umedă)

L = raportul lipidic (pe baza greutății umede)

C_p = concentrația substanței de testat în pește (mg kg⁻¹ greutate umedă)

În cazul în care analiza lipidelor nu a fost efectuată pe toți peștii eșantionați, se utilizează o valoare medie a lipidelor pentru normalizarea BCF. Pentru BCF în starea staționară, se utilizează valoarea medie înregistrată la finalul fazei de absorbție în grupul de tratament. Pentru normalizarea unui BCF cinetică, pot exista unele cazuri în care se justifică o abordare diferită, de exemplu în cazul în care conținutul lipidic s-a schimbat radical în cursul fazelor de absorbție și de eliminare. Cu toate acestea, se utilizează în mod curent o rată de alimentare care minimizează modificările dramatice în conținutul lipidic.

$$BCF_{KL} = \frac{0,05}{L_n} \cdot BCF_K \quad [\text{Ecuția A5.30}]$$

unde

BCF_{KL} = BCF cinetică normalizat lipidic (L kc⁻¹)

L_n = raportul lipidic mediu (pe baza greutății umede)

BCF_K = BCF cinetică (L kc⁻¹)

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343–2355.
- (2) Chapter C.20 of this Annex, *Daphnia magna* Reproduction Test.
- (3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1: 309-320.
- (4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.

-
- (6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.
- (7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
- (8) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
- (9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. *T. Am. Fish. Soc.* 104: 785-792.
- (10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*, Sheeman, P., *et al.*, Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.
- (11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. *Can. J. Chem. Eng.* 55: 614-622.
- (12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.
- (13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. *Chemosphere*. 9: 3-19.
-

Apendicele 6

SECȚIUNEA DE ECUAȚII PENTRU TESTUL DE EXPUNERE PRIN APĂ: MODEL DE TESTARE MINIMIZAT

Justificarea acestei abordări constă în faptul că factorul de bioconcentrare într-un test complet poate fi determinat ca un factor de bioconcentrare în stare staționară (BCF_{ss}) prin calcularea raportului între concentrația substanței de testat în țesutul peștelui și concentrația substanței de testat în apă sau prin calcularea factorului de bioconcentrare cinetică (BCF_k) ca fiind raportul dintre constanta de viteză de absorbție k_1 și constanta de viteză de eliminare k_2 . BCF_k este valabil chiar dacă nu se atinge o concentrație în stare staționară a substanței în timpul absorbției, cu condiția ca absorbția și eliminarea să acționeze aproximativ în conformitate cu procesele cinetice de ordinul întâi.

În cazul în care se efectuează o măsurare a concentrației de substanță în țesuturi (C_{p1}) în momentul în care expunerea se încheie (t_1) și concentrația în țesut (C_{p2}) se măsoară din nou după scurgerea unui anumit interval de timp (t_2), se poate estima constanta de viteză de eliminare k_2 utilizând ecuația A5.22 din apendicele 5.

Ulterior se poate determina algebric constanta de viteză de absorbție, k_1 , utilizând ecuația A5.23 din apendicele 5 (unde $C_p = C_{p1}$ și $t = t_1$) (1). Factorul de bioconcentrare cinetică pentru modelul minimizat (desemnat ca BCF_{km} pentru a se distinge de factorii de bioconcentrare determinați utilizând alte metode) este:

$$BCF_{km} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{Ecuația A6.1}]$$

Se corectează concentrațiile și rezultatele pentru diluția de creștere și se normalizează la un conținut lipidic în pește de 5 %, astfel cum este descris în apendicele 5.

BCF_{ss} minimizat este BCF calculat la finalul fazei de absorbție, presupunând că starea staționară a fost atinsă. Acest lucru nu poate fi decât presupus, întrucât numărul de puncte de eșantionare nu este suficient pentru a dovedi acest lucru.

$$\text{minimizat } BCF_{ss} = \frac{C_{p - \text{minSS}}}{C_{a - \text{minSS}}} \quad [\text{Ecuația A6.2}]$$

Unde

$C_{p-\text{minSS}}$ = Concentrația în pește la starea staționară presupusă la sfârșitul absorbției (mg kg^{-1} greutate umedă).

$C_{a-\text{minSS}}$ = Concentrația în apă la starea staționară presupusă la sfârșitul absorbției (mg l^{-1}).

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271-2280.

Apendicele 7

SECȚIUNEA DE ECUAȚII PENTRU TESTUL DE EXPUNERE PRIN ALIMENTAȚIE

1. Exemplu de cantități constitutive ale unui furaj pentru pești comercial adecvat
2. Exemple de tehnici de îmbogățire a alimentelor
3. Calcularea eficacității asimilării și a factorului de bioamplificare
4. Corecție lipidică
5. Evaluarea diferențelor dintre concentrația la momentul ($C_{0,m}$) și concentrația determinată la momentul zero ($C_{0,d}$)
6. Orientări pentru substanțele de testat cu eliminare foarte rapidă

1. EXEMPLU DE CANTITĂȚI CONSTITUTIVE ALE UNEI HRANE COMERCIALE PENTRU PEȘTI ADECVATE

Component principal	Făină de pește
Proteină brută	$\leq 55,0 \%$
Grăsimi brute	$\leq 15,0 \%$ ⁽¹⁾
Fibră brută	$\geq 2,0 \%$
Umiditate	$\geq 12 \%$
Cenușă	$\geq 8 \%$

⁽¹⁾ În unele regiuni, se poate obține numai furaj pentru pești cu o concentrație lipidică care este departe de această limită superioară. În astfel de cazuri, studiile se desfășoară cu cea mai scăzută concentrație lipidică în hrana astfel cum a fost furnizată și rata de alimentare se ajustează în mod corespunzător pentru a menține sănătatea peștilor. Lipidele alimentare nu se măresc artificial prin adăugarea unui exces de ulei.

2. EXEMPLE DE TEHNICI DE ÎMBOGĂȚIRE A ALIMENTELOR

Generalități

Hrana martor se pregătește în exact același mod ca hrana îmbogățită, dar cu absența substanței de testat.

Pentru a verifica concentrația din hrană tratată, se extrag eșantioane în trei exemplare din alimentele dozate cu o metodă de extracție adecvată și se măsoară concentrația substanței de testat sau radioactivitatea în extrase. Se demonstrează recuperările analitice ridicate ($> 85 \%$) cu diferențe nesemnificative între eșantioane (trei eșantioane de concentrații pentru substanță prelevate la începutul testului nu trebuie să varieze cu mai mult de $\pm 15 \%$ de la valoarea medie).

În timpul testului alimentar, se colectează trei eșantioane pentru analiză în ziua 0 și la finalul fazei de absorbție pentru determinarea conținutului de substanță de testat în hrană.

Pregătirea hranei pentru pește cu un material de testat lichid (pur)

Se setează un obiectiv privind concentrația nominală de testare în hrana pentru pești tratată, de exemplu 500 µg substanță de testat/g de produs alimentar. Se adaugă cantitatea adecvată (în masa molară sau radioactivitatea specifică) din substanța de testat pură la o masă cunoscută de hrană pentru pești într-un borcan din sticlă sau într-un balon de evaporator rotativ. Masa hranei pentru pești trebuie să fie suficientă pentru durata fazei de absorbție (luând în considerare necesitatea unor cantități din ce în ce mai mari de hrană la fiecare hrănire din cauza creșterii peștilor). Hrana peștilor/substanța de testat se amestecă peste noapte prin rotație lentă (de exemplu, cu ajutorul unui mixer rotativ sau prin rotație în cazul în care se utilizează un balon de evaporator rotativ). Alimentele îmbogățite se păstrează în condiții care mențin stabilitatea substanței de testat în amestecul de hrană (de exemplu, refrigerare) până la utilizare.

Pregătirea hranei pentru pește cu un vehicul de ulei de porumb sau de pește

Substanțele de testat în stare solidă se macină într-un mojar într-o pulbere fină. Substanțele de testat lichide se pot adăuga direct în uleiul de porumb sau de pește. Se dizolvă substanța de testat într-o cantitate cunoscută de ulei de porumb sau de pește (de exemplu de 5-15 ml). Se transferă cantitativ uleiul dozat într-un balon de evaporare de tip rotativ de dimensiuni adecvate. Flaconul utilizat la prepararea uleiului dozat se spală cu două părți mici de ulei și acestea se adaugă în balon pentru a se asigura că se transferă toată substanța de testat dizolvată. Pentru a asigura dizolvarea completă/dispersia în ulei (sau în cazul în care mai mult de o substanță de testat este utilizată în cadrul studiului) se adaugă un micro-agitator, se filetează flaconul și amestecul se agită rapid peste noapte. Se adaugă o cantitate adecvată de hrană pentru pești (de regulă sub formă de peletă) pentru test în balon și se amestecă conținutul balonului în mod omogen prin rotirea continuă a balonului de sticlă pentru cel puțin 30 de minute, dar de preferință peste noapte. Ulterior, se depozitează în mod corespunzător hrana îmbogățită (de exemplu, se refrigerază) pentru a asigura stabilitatea substanței de testat în alimente până la utilizare.

Pregătirea hranei pentru pește cu un solvent organic

Se dizolvă o cantitate adecvată de substanță de testat (în masă molară sau radioactivitate specifică) suficientă pentru a atinge doza țintă într-un solvent organic adecvat (de exemplu, ciclohexan sau acetonă; 10-40 ml, dar un volum mai mare, dacă este necesar, în funcție de cantitatea de hrană pentru îmbogățit). Se amestecă fie o parte sau toate părțile (adăugate porție după porție) din această soluție cu masa corespunzătoare de hrană pentru pești suficientă pentru ca testul să atingă nivelul de doză nominal necesar. Hrana/substanța de testat se poate amesteca într-un vas de amestecare din oțel inoxidabil și hrana pentru pești proaspăt dozată din vas se lasă într-o hotă de laborator timp de două zile (se agită ocazional) pentru a permite evaporarea solventului în exces sau se amestecă într-un balon de evaporator rotativ cu rotație continuă. Solventul în exces poate fi „suflat” sub un curent de aer sau de azot, dacă este necesar. Se acordă atenție deosebită pentru a asigura că substanța de testat nu se cristalizează pe măsură ce se îndepărtează solventul. Hrana îmbogățită se depozitează în condiții (de exemplu, refrigerare) care să mențină stabilitatea substanței de testat în amestecul de hrană până la utilizare.

3. CALCULAREA EFICACITĂȚII ASIMILĂRII ȘI A FACTORULUI DE BIOAMPLIFICARE

Pentru calcularea eficacității asimilării, se estimează mai întâi constanta vitezei de eliminare totală în conformitate cu punctul 4 din apendicele 5 (utilizând „metoda secvențială”, și anume, regresia liniară standard) utilizând concentrațiile medii ale eșantioanelor din faza de eliminare. Constanta de viteză de hrănire, I , și durata de absorbție t sunt parametrii cunoscuți ai studiului. $C_{\text{hrană}}$, concentrația medie măsurată a substanței de testat în hrană este o variabilă măsurată în studiu. $C_{0,d}$, concentrația substanței de testat în pește la sfârșitul fazei de absorbție, este derivată, de regulă, din ordonata la origine a graficului a $\ln(\text{concentrației})$ în funcție de ziua de eliminare.

Eficacitatea asimilării substanței (a, absorbția de-a lungul intestinului) se calculează după cum urmează:

$$\alpha = \frac{C_{0,e} \cdot k_2}{I \cdot C_{hrană}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad [\text{Ecuția A7.1}]$$

unde:

$C_{0,e}$ = concentrația derivată în pește la timpul zero al fazei de eliminare (mg kg⁻¹);

k_2 = constanta de viteză de eliminare totală (nu corectată pentru creștere) calculată în conformitate cu ecuațiile din apendicele 5, punctul 3;

I = constanta de viteză de ingestie alimentară (g aliment g⁻¹ pește ziua⁻¹);

$C_{hrană}$ = concentrația în hrană (mg kg⁻¹ aliment);

t = durata perioadei de alimentație (zi)

Cu toate acestea, constanta de viteză de alimentație, I , utilizată în calcul ar putea necesita ajustare pentru creșterea peștilor, pentru a furniza o eficacitate de asimilare exactă, a. În cadrul unui test în care peștii cresc în mod semnificativ pe durata fazei de absorbție (în care nu se efectuează nicio corecție a cantităților de hrană pentru a menține rata de alimentare stabilită), rata de alimentare efectivă pe măsură ce avansează faza de absorbție va fi mai mică decât cea stabilită, având ca rezultat o eficacitate de asimilare „reală” mai ridicată. (Se remarcă faptul că acest lucru nu este important pentru calculul total al BMF, întrucât termenii I se anulează efectiv între ecuația A7.1 și ecuația A7.4). Rată de alimentare medie corectată pentru diluția de creștere, I_c , poate fi obținută în mai multe moduri, dar un mod simplu și riguros este utilizarea constantei de creștere cunoscută (k_c) pentru a estima greutatea peștilor de testat la intervale stabilite în cursul fazei de absorbție, și anume:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_c t} \quad [\text{Ecuția A7.2}]$$

unde

$W_p(t)$ = greutatea medie a peștelui în ziua t de absorbție

$W_{p,0}$ = greutatea medie a peștelui la începutul experimentului

În acest mod se poate estima (cel puțin) greutatea medie a peștelui în ultima zi de expunere ($W_{p,\text{sfârșit de absorbție}}$). Având în vedere faptul că rata de alimentare a fost stabilită pe baza $W_{p,0}$, se poate calcula rata de alimentare efectivă pentru fiecare zi de absorbție utilizând aceste două valori ale greutății. Se poate calcula ulterior rata de alimentare corectată pentru creștere, I_c (g aliment g⁻¹ pește zi⁻¹) pentru a fi utilizată în locul I în cazuri de creștere rapidă în cursul fazei de absorbție, ca

$$I_c = \frac{I \times W_{p,0}}{W_{p,\text{sfârșit de absorbție}}} \quad [\text{Ecuția A7.3}]$$

Odată ce s-a obținut eficacitatea asimilării, se poate calcula BMF prin înmulțirea acesteia cu constanta de viteză de alimentare I (sau I_c , în cazul în care este utilizată pentru a calcula α) și prin împărțirea acestui rezultat la constanta de viteză de eliminare totală k_2 :

$$\text{BMF} = \frac{I \times \alpha}{k_{2c}} \quad [\text{Ecuția A7.4}]$$

Se calculează, de asemenea, factorul de bioamplificare corectat pentru creștere în același mod, utilizând constanta de viteză de eliminare corectată pentru creștere (astfel cum a fost obținută la punctul 7 din apendicele 5). Din nou, în cazul în care s-a utilizat I_c pentru a calcula α , se utilizează, de asemenea, aici, în locul I :

$$\text{BMF} = \frac{I \times \alpha}{k_{2c}} \quad [\text{Ecuția A7.5}]$$

unde:

α = eficacitatea asimilării (absorbția substanței de testat de-a lungul intestinului);

k_2 = constanta de viteză de eliminare totală (nu corectată pentru creștere) calculată în conformitate cu ecuațiile din apendicele 5, punctul 3;

k_{2c} = constanta de viteză de eliminare corectată pentru creștere (ziua⁻¹);

I = constanta de viteză de ingestie alimentară (g aliment g⁻¹ pește ziua⁻¹);

Timpul de înjumătățire corectat pentru creștere ($t_{1/2}$) se calculează după cum urmează:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{2c}} \quad [\text{Ecuația A7.6}]$$

Se poate estima, de asemenea, eficacitatea asimilării substanței din alimentație în cazul în care reziduurile tisulare sunt determinate în timpul fazei liniare ale fazei de absorbție (între zilele 1 și 3). În acest caz, se poate determina eficacitatea asimilării substanței (α) după cum urmează:

$$\alpha = \frac{C_{\text{pește}}(t)}{I \times C_{\text{hrană}} \times t} \quad [\text{Ecuația A7.7}]$$

Unde

$C_{\text{pește}}(t)$ = concentrația substanței de testat în pește la momentul t (mg kg⁻¹ greutate umedă).

4. CORECȚIE LIPIDICĂ

În cazul în care conținutul lipidic a fost măsurat pe același pește precum analiza chimică pentru toate intervalele de eșantionare, atunci concentrațiile individuale se corectează pe o bază de lipide și se reprezintă grafic $\ln$ (concentrație, corectată lipidic) în funcție de eliminare (zi) pentru a furniza $C_{0,d}$ și k_2 . Se poate calcula ulterior eficacitatea asimilării (ecuația A7.1) pe o bază de lipide, utilizând $C_{\text{hrană}}$ pe o bază de lipide (și anume, se înmulțește $C_{\text{hrană}}$ cu raportul lipidic mediu din hrană). Calcularea ulterioară utilizând ecuația A7.4 și ecuația A7.5 va furniza BMF corectat lipidic (și corectat pentru diluția de creștere) în mod direct.

În caz contrar, se determină raportul lipidic mediu (g/g) în pești și în alimente pentru grupurile de tratament și martor (pentru hrană și grupul martor această valoare se obține, de regulă, din datele măsurate la începutul și finalul expunerii; pentru grupul de pești de tratament, această valoare se obține, de regulă, din datele măsurate numai la finalul expunerii). În unele studii, conținutul lipidic al peștelui poate să crească semnificativ; în astfel de cazuri, este mai oportun să se utilizeze concentrația lipidică medie a peștilor de testat calculată pornind de la valorile măsurate la sfârșitul expunerii și la sfârșitul eliminării. În general, datele provenite numai de la grupul de tratament se utilizează pentru a obține ambele raporturi lipidice.

Factorul de corecție lipidică (L_c) se calculează după cum urmează:

$$L_c = \frac{L_{\text{pește}}}{L_{\text{hrană}}} \quad [\text{Ecuația A7.8}]$$

unde $L_{\text{pește}}$ și $L_{\text{hrană}}$ sunt raporturile lipidice medii în pește și respectiv, în hrană.

Factorul de corecție lipidică este utilizat pentru a calcula factorul de bioamplificare corectat lipidic (BMF_L):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_c} \quad [\text{Ecuația A7.9}]$$

5. EVALUAREA DIFERENȚELOR DINTRE CONCENTRAȚIA MĂSURATĂ LA MOMENTUL ZERO ($C_{0,m}$) ȘI CONCENTRAȚIA DETERMINATĂ LA MOMENTUL ZERO ($C_{0,d}$)

Se compară concentrația măsurată la momentul zero ($C_{0,m}$) și concentrația determinată la momentul zero ($C_{0,d}$). În cazul în care acestea sunt foarte similare, acest lucru sprijină modelul de ordin întâi utilizat pentru determinarea parametrilor de eliminare.

În unele studii, poate exista o diferență considerabilă între concentrația determinată la momentul zero $C_{0,m}$ și concentrația măsurată la momentul zero. $C_{0,m}$ (a se vedea ultima liniuță de la punctul 159 din prezenta metodă de testare). În cazul în care $C_{0,d}$ este în mod semnificativ mai scăzută decât $C_{0,m}$ ($C_{0,d} \ll C_{0,m}$), diferența poate indica prezența unor produse alimentare îmbogățite nedigerate în intestin. Acest lucru poate fi testat în mod experimental, prin efectuarea unei analize separate pe intestinul excizat în cazul în care au fost prelevate și depozitate eșantioane suplimentare (pește întreg) la finalul fazei de absorbție. În caz contrar, dacă un test pentru detectarea valorilor aberante valid din punct de vedere statistic aplicat regresiei liniare a fazei de eliminare indică faptul că primul punct de eșantionare al eliminării este ridicat în mod eronat, ar putea fi adecvată efectuarea regresiei liniare pentru a determina k_2 , dar omițând prima concentrație de eliminare. În astfel de cazuri, dacă incertitudinea în ceea ce privește regresia liniară este foarte scăzută și este clar că au fost respectate cineticele de aproximativ ordinul întâi de eliminare, poate fi adecvată utilizarea valorilor rezultate $C_{0,d}$ și k_2 la calcularea eficacității de asimilare. Acest lucru se justifică în totalitate în raport. Este posibil, de asemenea, ca în faza de eliminare să nu fi operat cinetica de ordinul întâi. În cazul în care acest lucru este posibil (și anume, datele logaritmului natural transformat par să urmeze o curbă comparată cu graficul liniei drepte a regresiei liniare), atunci calculele pentru k_2 și $C_{0,d}$ sunt puțin probabil să fie valabile și se solicită consiliere din partea unui biostatistician.

În cazul în care $C_{0,d}$ este mult mai mare decât valoarea măsurată ($C_{0,d} \gg C_{0,m}$), acest lucru poate indica: faptul că substanța a fost eliminată foarte rapid (și anume, punctele de eșantionare s-au apropiat de limita de cuantificare a metodei analitice foarte devreme în faza de eliminare, a se vedea punctul 6 de mai jos); faptul că a existat o abatere de la cinetica de ordinul întâi; faptul că regresia liniară pentru a determina k_2 și $C_{0,d}$ este eronată; sau faptul că a existat o problemă cu concentrația măsurată în studiu la unele puncte de eșantionare. În astfel de cazuri, se verifică reprezentarea regresiei liniare pentru dovezi de eșantioane la nivelul sau aproape de limita de cuantificare, pentru valori aberante și pentru curbura evidentă (sugerând altă cinetică decât de ordinul întâi) și se evidențiază în raport. Se descrie și se justifică orice reevaluare ulterioară a regresiei liniare pentru a îmbunătăți valorile estimate. În cazul în care este observă abateri semnificative de la cinetica de ordinul întâi, atunci calculele pentru k_2 și $C_{0,d}$ sunt puțin probabil să fie valabile și se solicită sfatul unui biostatistician.

6. ORIENTĂRI PENTRU SUBSTANȚELE DE TESTAT CU ELIMINARE FOARTE RAPIDĂ

Astfel cum s-a discutat la punctul 129 din metoda de testare, unele substanțe se pot elimina atât de rapid încât nu se poate determina o concentrație fiabilă la momentul zero $C_{0,d}$ și k_2 deoarece în eșantioanele prelevate foarte devreme în faza de eliminare (și anume, începând de la al doilea eșantion de eliminare) substanța nu mai este măsurată în mod efectiv (concentrații raportate la limita de cuantificare). Această situație a fost observată în testul interlaboratoare efectuat în sprijinul acestei metode de testare cu benzo[a]piren și a fost documentată în raportul de validare pentru metodă. În astfel de cazuri, o regresie liniară nu poate fi efectuată în mod fiabil și este susceptibilă să furnizeze o estimare nerealistic de mare a $C_{0,d}$, având ca rezultat o eficacitate de asimilare aparentă mult mai mare de 1. Este posibil să se calculeze o estimare conservatoare a k_2 și un BMF de limită superioară în astfel de cazuri.

Utilizarea punctelor de date respective din faza de eliminare în cazul în care a fost măsurată o concentrare până și inclusiv la prima concentrație „nedetectată” (concentrația stabilită la limita de cuantificare), o regresie liniară (utilizând logaritmul natural transformat de date de concentrație în funcție de timp) va furniza o estimare a k_2 . Pentru astfel de cazuri, acest lucru este posibil să implice numai două puncte de date (de exemplu, eșantionarea zilelor 1 și 2 de eliminare) și ulterior se poate estima k_2 utilizând ecuația A 5.22 din apendicele 5. Această estimare k_2 poate fi utilizată pentru a estima o eficacitate de asimilare în conformitate cu ecuația A7.1, înlocuind valoarea $C_{0,d}$ în ecuație cu concentrația măsurată la momentul zero ($C_{0,m}$) în cazurile în care $C_{0,d}$ este în mod clar estimată a fi mult mai mare decât ar fi putut fi atinsă în cadrul testului. În cazul în care $C_{0,m}$ nu a fost măsurabilă, se utilizează limita de detecție în țesuturile peștilor. În cazul în care, în anumite cazuri, acest lucru furnizează o valoare $\alpha > 1$, atunci se presupune că eficacitatea asimilării ca 1 este „cel mai rău caz”.

Se poate estima ulterior BMF_k maxim utilizând ecuația A7.4 și se desemnează ca o valoare „mult mai mică decât” ($<<$). De exemplu, pentru un studiu efectuat cu o rată de alimentare de 3 % și un timp de înjumătățire al eliminării mai mic de 3 zile și α în „cel mai rău caz” de 1, BMF_k este probabil sub aproximativ 0,13. Având în vedere scopul acestei estimări, precum și faptul că valorile vor fi conservatoare în natură, nu este necesară corecția acestora pentru diluția de creștere sau conținut lipidic în pește sau hrană.

Apendicele 8

ABORDĂRI PENTRU A ESTIMA POSIBILI BCF DIN DATELE COLECTATE ÎN STUDIUL DE EXPUNERE PRIN ALIMENTAȚIE

Metoda alimentară este inclusă în prezenta metodă de testare pentru testarea bioacumulării substanțelor care nu pot fi testate în practică utilizând metoda expunerii prin apă. Metoda expunerii prin apă furnizează un factor de bioconcentrare, în timp ce metoda alimentară conduce direct la informații privind potențialul de bioamplificare prin alimentație. În numeroase regimuri de securitate chimică sunt necesare informații privind bioconcentrarea acvatică (de exemplu, pentru evaluarea riscurilor și Sistemul global armonizat de clasificare). Prin urmare, este necesar să se utilizeze datele generate în cadrul unui studiu alimentar pentru a estima un factor de bioconcentrare comparabil cu testele efectuate în conformitate cu metoda expunerii prin apă ⁽¹⁾. Această secțiune analizează abordări care pot fi urmate în acest scop, recunoscând, în același timp, deficiențele care sunt inerente estimărilor.

Studiile aportului alimentar măsoară eliminarea pentru a furniza o constantă de viteză de eliminare, k_2 . În cazul în care o constantă de viteză de absorbție poate fi estimată pe baza datelor disponibile pentru situația în care peștii au fost expuși la substanța de testat prin apă, atunci se poate estima un BCF.

Estimarea unei constante de viteză de absorbție pentru expunerea în apă a unei substanțe de testat se bazează pe numeroase ipoteze, care vor contribui toate la incertitudinea estimării. În plus, această abordare de a estima un BCF presupune că rata de eliminare totală (inclusiv factorii care contribuie, precum distribuția în corp și procesele de eliminare individuale) să fie independentă de tehnica de expunere utilizată pentru a produce un conținut corporal de substanță de testat.

Principalele ipoteze inerente abordării de estimare pot fi rezumate după cum urmează.

Eliminarea în urma absorbției alimentare este aceeași cu eliminarea în urma expunerii prin apă pentru o anumită substanță

Absorbția din apă ar urmări cinetica de ordin întâi

În funcție de metoda utilizată pentru a estima absorbția:

- absorbția poate fi corelată numai cu greutatea peștelui
- absorbția poate fi corelată numai cu coeficientul de partiție octanol-apă al substanței
- absorbția poate fi corelată cu o combinație a greutatei peștelui și a coeficientului de partiție octanol-apă al substanței
- factorii care pot afecta absorbția într-un studiu de expunere prin apă în practică precum biodisponibilitatea substanței, adsorbția în aparate, dimensiunea moleculară, etc. au un efect redus
- și, esențial:

Baza de date („setul de formare”) utilizat pentru elaborarea metodei de estimare a absorbției este reprezentativă pentru substanța luată în considerare

O serie de publicații din literatura de specialitate accesibilă au determinat ecuații care leagă absorbția din apă în pești prin branhii cu un coeficient de partiție octanol/apă al substanței, greutatea peștelui (1) (2) (3) (4), volumul și/sau conținutul lipidic, permeabilitatea/difuzia membranei (5) (6), volumul de ventilație al peștelui (7) și o abordare a fugacității/echilibrului masic (8) (9) (10). O evaluare detaliată a unor astfel de metode în acest context este furnizată în Crookes & Brooke (11). O publicație a lui Barber (12) axată pe modelarea bioacumulării prin absorbția alimentară este utilă, de asemenea, în acest context, deoarece include modele de rate de absorbție prin branhii. O secțiune din documentul de fundamentare al protocolului alimentar din 2004 (13) a fost consacrată, de asemenea, acestui aspect.

⁽¹⁾ În sălbăticie, calea care conduce la cea mai mare expunere în mediile apoase este probabil prin ingestie pentru substanțele foarte hidrofobe și, prin urmare, un BCF estimat nu este strict reprezentativ pentru potențialul de bioacumulare al unei astfel de substanțe.

Cele mai multe dintre aceste modele par să fi fost obținute utilizând baze de date reduse. Pentru modelele pentru care sunt disponibile detalii cu privire la baza de date utilizată pentru a construi modelul, reiese faptul că tipurile de substanțe utilizate adesea sunt de o structură sau clasa similară (în termeni de funcționalitate, de exemplu, organoclorurate). Aceasta se adaugă la incertitudinea utilizării unui model pentru a estima o constantă de viteză de absorbție pentru un alt tip de substanță, în plus față de considerațiile specifice testului precum speciile, temperatura etc.

O revizuire a tehnicilor disponibile (11) a subliniat faptul că nicio metodă nu este „mai corectă” decât celelalte. Prin urmare, ar trebui să se furnizeze o justificare clară pentru modelul utilizat. În cazul în care există mai multe metode ale căror utilizare poate fi justificată, poate fi prudent să se prezinte mai multe estimări ale k_1 (și, prin urmare, BCF) sau o plajă de valori pentru k_1 (și BCF) în conformitate cu mai multe metode de estimare a absorbției. Cu toate acestea, având în vedere diferențele în ceea ce privește tipurile de modele și seturile de date utilizate pentru a elabora acestora, calcularea unei valori medii din estimările determinate în moduri diferite nu ar fi adecvată.

Unii cercetători au afirmat că estimările BCF de acest tip necesită o corecție de biodisponibilitate pentru a ține seama de adsorbția unei substanțe la carbonul organic dizolvat (COD) în condiții de expunere prin apă, pentru a aduce estimările în concordanță cu rezultatele obținute în urma studiilor de expunere prin apă [de exemplu, (13), (14)]. Cu toate acestea, această corecție ar putea să nu fie adecvată, având în vedere nivelurile scăzute de COD necesare într-un studiu de expunere prin apă pentru o estimare „în cel mai rău caz” (și anume, raportul dintre o substanță biodisponibilă la substanța astfel cum este măsurată în soluție). În cazul substanțelor foarte hidrofobe, absorbția la nivelul branhiilor poate deveni limitată de rata de difuzie pasivă în apropierea suprafeței branhiilor; în acest caz este posibil ca corecția să fie răspunzătoare pentru acest efect mai degrabă decât pentru scopul în care a fost concepută.

Se recomandă concentrarea pe metode care necesită intrări pentru care datele vor fi disponibile cu ușurință pentru substanțele testate în conformitate cu studiul aportului alimentar descris aici (și anume, K_{OW} , greutatea peștelui). Se pot aplica alte metode care necesită intrări mai complexe, dar ar putea fi necesare măsurători suplimentare în cadrul testului sau cunoștințe detaliate privind substanța de testat sau speciile de pești, care pot să nu fie disponibile pe scară largă. În plus, alegerea modelului poate fi influențată de nivelul de validare și domeniul de aplicabilitate [a se vedea (11) pentru o revizuire și o comparație a diferitelor metode].

Trebuie să se țină cont de faptul că estimarea k_1 rezultată și BCF estimat sunt incerti și ar putea fi necesar să fie tratați într-o abordare pe baza forței probante a datelor împreună cu BMF determinat și parametrii substanței (de exemplu, dimensiunea moleculară) pentru o imagine de ansamblu a potențialului de bioacumulare al unei substanțe. Interpretarea și utilizarea acestor parametri poate depinde de cadrul de reglementare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 25: 1-14.
- (2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. *Aquat. Toxicol.* 30: 325-341.
- (3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 1963-1992.
- (5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in *Aquatic Toxicology and Environmental Fate*, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.

- (6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343-2355.
- (7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699707.
- (8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 13991420.
- (9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. *Environ. Sci. Technol.* 31: 577-583.
- (10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. *QSAR Comb. Sci.* 22: 337-345.
- (11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.
- (12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 755-777
- (13) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in *Handbook of property estimation methods for chemicals*, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA: 189-231."

(17) În partea C, capitolul C.20 se înlocuiește cu următorul text:

„C.20 Testul de reproducere pentru *Daphnia magna*

INTRODUCERE

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 211 (2012). Orientările OCDE privind testarea sunt revizuite periodic pentru a lua în considerare progresul științific. Orientarea 211 privind testarea reproducerii provine din Orientarea nr. 202, partea II, test de reproducere la specia *Daphnia* (1984). În general, s-a recunoscut faptul că datele din testele efectuate în conformitate cu orientarea TG 202 ar putea fi variabile. Aceasta a condus la eforturi considerabile pentru identificarea motivelor variabilității cu scopul de a produce o metodă de testare mai bună. Orientarea 211 privind testarea se bazează pe rezultatele acestor activități de cercetare, teste interlaboratoare și studii de validare efectuate în 1992 (1), 1994 (2) și 2008 (3).

Principalele diferențe între versiunea inițială (TG 202, 1984) și a doua versiune (TG 211, 1998) ale orientării privind testarea reproducerii sunt:

- specia recomandată pentru utilizare este *Daphnia magna*;
- durata testului este de 21 de zile;
- pentru testele semistatice, numărul de animale care urmează să fie utilizate la fiecare concentrație de testat a fost redus de la cel puțin 40, de preferință împărțite în patru grupe de câte 10 animale, la cel puțin 10 animale ținute în mod individual (cu toate că se pot utiliza diferite modele pentru testele în regim dinamic);

- au fost efectuate recomandări mai specifice cu privire la mediul de testare și condițiile de alimentație.
- principalele diferențe dintre a doua versiune a orientării privind testarea reproducerii (TG 211, 1998) și prezenta versiune sunt:
- a fost adăugat appendicele 7 pentru a descrie procedurile de identificare a sexului nou-născuților, dacă este necesar. În conformitate cu versiunile anterioare ale acestei metode de testare, raportul dintre sexe este un parametru opțional;
- numărul variabilelor de răspuns al descendenților în viață produși de fiecare animal părinte supraviețuitor a fost completat cu o variabilă de răspuns suplimentară pentru reproducerea dafniei, și anume numărul total de descendenți în viață produși la sfârșitul testului de fiecare părinte dafnia, la începutul testului eliminându-se din analiză mortalitatea parentală accidentală și/sau inadvertentă. Scopul variabilei de răspuns adăugate este de a alinia această variabilă de răspuns cu alte metode de testare de reproducere pe nevertebrate. În plus, în ceea ce privește această variabilă de răspuns, este posibil ca, în prezenta metodă de testare, să se elimine o sursă de erori, și anume efectul de mortalitate parentală accidentală și/sau inadvertentă, în cazul în care aceasta apare în timpul perioadei de expunere.
- orientări statistice suplimentare pentru modelul de testare și pentru interpretarea rezultatelor au fost incluse atât pentru CEx (de exemplu CE10 sau CE50), cât și pentru abordarea CFEO/CME0.
- se introduce un test limită.

Definițiile utilizate sunt prezentate în appendicele 1.

PRINCIPIUL TESTULUI

Obiectivul principal al testului este evaluarea efectului substanțelor chimice asupra randamentului de reproducere al *Daphnia magna*. În acest scop, femelele tinere de dafnia (animale părinți), în vârstă de mai puțin de 24 de ore la începutul testului, sunt expuse la substanța de testat adăugată într-o serie de concentrații diferite. Durata testului este de 21 de zile. La sfârșitul testului, se evaluează numărul total de descendenți în viață produși. Capacitatea de reproducere a exemplarelor părinți se poate exprima în alte moduri (de exemplu, numărul de descendenți în viață produși per animal per zi, din prima zi în care s-au observat descendenții), dar acestea se raportează în plus față de numărul total de descendenți în viață produși la sfârșitul testului. Având în vedere conceperea deosebită a testului în regim semistatic în comparație cu alte metode de testare a reproducerii la nevertebrate, este posibil, de asemenea, să contabilizeze numărul de descendenți în viață produși de fiecare animal părinte. Aceasta permite ca, spre deosebire de alte metode de testare a reproducerii la nevertebrate, în cazul în care animalul părinte moare în mod accidental și/sau în mod inadvertent în timpul perioadei de testare, producția de descendenți a acestuia să poată fi exclusă din evaluarea datelor. Prin urmare, în cazul în care mortalitatea parentală apare la replicile expuse, se ia în considerare dacă mortalitatea urmează sau nu un tipar concentrație-răspuns, de exemplu în cazul în care există un regres important al răspunsului în funcție de concentrația substanței chimice de testat cu o pantă pozitivă (în acest sens se poate utiliza un test statistic precum testul de stabilire a tendinței Cochran-Armitage). În cazul în care mortalitatea nu urmează un tipar concentrație-răspuns, atunci se exclude din analiza rezultatelor testului acele replici cu mortalitate parentală. În cazul în care mortalitatea urmează un tipar concentrație-răspuns, mortalitatea parentală se atribuie unui efect al substanței chimice de testat și replicile nu se exclude din analiză. Dacă animalul părinte moare în timpul testului și anume, accidental din utilizarea necorespunzătoare ori ca urmare a unui accident, sau inadvertent din cauza unui incident inexplicabil care nu are legătură cu efectul substanței chimice de testat, sau se dovedește a fi mascul, atunci replica se exclude din analiză (pentru detalii, a se vedea punctul 51). Efectul toxic al substanței chimice de testat asupra capacității de reproducere este exprimat ca CEx prin introducerea datelor într-un model adecvat prin regresie nelineară pentru a estima concentrația care ar produce o reducere cu x % a capacității de reproducere, respectiv sau în mod alternativ, ca valoarea CFEO/CME0 (4). *Concentrațiile de testat, de preferință, trebuie să încadreze cea mai mică dintre concentrații de efect utilizate (de exemplu, CE₁₀), ceea ce înseamnă că această valoare se calculează prin interpolare și nu extrapolare.*

Se raportează, de asemenea, supraviețuirea animalelor părinți și timpul până la producerea primilor pui. Se pot examina, de asemenea, alte efecte ale substanței chimice asupra unor parametri precum creșterea (de exemplu, lungimea) și posibil rata intrinsecă de înmulțire a populației (a se vedea punctul 44).

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTAT

Rezultatele unui test de toxicitate acută (a se vedea capitolul C.2 din prezenta anexă: *Daphnia* sp. testul imobilizării acute) efectuat cu *Daphnia magna* pot fi utile la selectarea unui interval adecvat de concentrații în testele de reproducere. Este necesar să se cunoască solubilitatea în apă și presiunea de vapori a substanței chimice de testat și să existe o metodă analitică fiabilă pentru determinarea cantitativă a substanței chimice în soluțiile experimentale, cu eficiența recuperării și limita de detecție specificate.

Datele privind substanța chimică de testat care pot fi utile în stabilirea condițiilor de testare includ formula structurală, puritatea substanței chimice, stabilitatea la lumină, stabilitatea în condițiile testului, pKa, P_{ow} și rezultatele testului pentru biodegradabilitatea rapidă [a se vedea capitolele C.4 (determinarea biodegradabilității „rapide”) și C.29 (biodegradabilitatea rapidă – CO₂ în vase închise ermetic) din prezenta anexă].

VALIDITATEA TESTULUI

Pentru ca un test să fie valid, martorul (martorii) trebuie să îndeplinească următoarele criterii de performanță:

- mortalitatea animalelor părinți (femele de dafnia) să nu depășească 20 % la sfârșitul testului;
- numărul mediu de descendenți vii produși per animal părinte supraviețuitor la sfârșitul testului să fie ≥ 60 .

Notă: Același criteriu de validitate (20 %) poate fi utilizat pentru mortalitatea parentală accidentală și inadvertentă pentru martori, precum și pentru fiecare concentrație de testat.

DESCRIEREA METODEI

Aparatură

Vasele de testare și alte aparate care vor intra în contact cu soluțiile de testat trebuie să fie realizate în întregime din sticlă sau alt material inert din punct de vedere chimic. De regulă, vasele de testare sunt pahare Berzelius din sticlă.

În plus, vor fi necesare unele sau toate aparatele următoare:

- contor de oxigen (cu microelectrod sau alt dispozitiv corespunzător pentru măsurarea oxigenului dizolvat în probe de volum mic);
- aparatură adecvată pentru controlul temperaturii;
- pH-metru;
- aparat pentru determinarea durității apei;
- aparat pentru determinarea concentrației totale de carbon organic (COT) în apă sau aparat pentru determinarea consumului chimic de oxigen (CCO);
- aparat specific pentru controlul regimului de iluminare și măsurarea intensității luminii.

Organismul de testat

Specia care urmează să fie utilizată în test este *Daphnia magna* Straus ⁽¹⁾.

De preferință, clonul trebuie să fi fost identificat după genotip. Studiul (1) a arătat că performanța de reproducere a clonului A (care provine din IRCHA din Franța) (5) satisface complet criteriile de validitate pentru o medie de ≥ 60 descendenți vii per animal părinte supraviețuitor atunci când se cultivă în condițiile descrise în prezenta metodă. Cu toate acestea, se acceptă și alți cloni, cu condiția să se indice îndeplinirea de către cultura de dafnia a criteriilor de validitate pentru test.

⁽¹⁾ Se pot utiliza alte dafnii, cu condiția ca acestea să îndeplinească criteriile de validitate, după caz (criteriul de validitate referitor la capacitatea de reproducere la martori este relevant pentru toate speciile). În cazul în care se utilizează alte dafnii, acestea trebuie să fie identificate în mod clar și să se justifice utilizarea lor.

La începutul testului, animalele trebuie să fie mai tinere de 24 de ore și nu trebuie să fie prima generație. Acestea trebuie să provină dintr-o colonie sănătoasă (și anume, fără semne de stres, cum ar fi mortalitatea mare, prezența masculilor și ephippia, întârziere în producerea primilor descendenți, animale decolorate etc.). Animalele din colonie se mențin în condiții de cultură (lumină, temperatură, mediu, hrană și număr de animale per unitate de volum) similare cu cele utilizate în test. În cazul în care mediul de cultură care urmează să fie utilizat în test este diferit de cel pentru cultura obișnuită de dafnia, este o bună practică să se includă o perioadă de aclimatizare înaintea testului, de regulă de aproximativ trei săptămâni (și anume, o generație) pentru a evita stresarea animalelor părinți.

Mediul de testare

În cadrul acestui test, se recomandă utilizarea unui mediu bine definit. Acesta poate să evite utilizarea aditivilor (de exemplu, plante de mare, extract de sol) a căror caracterizare este dificilă și, prin urmare, se îmbunătățesc posibilitățile de standardizare între laboratoare. S-a dovedit că mediile Elendt M4 (6) și M7 (a se vedea apendicele 2) sunt potrivite în acest sens. Cu toate acestea, alte medii [de exemplu, (7) (8)] sunt acceptabile cu condiția ca acestea să asigure realizarea unei culturi de dafnia care să întrunească criteriile de validitate pentru test.

În cazul în care se utilizează medii conținând aditivi care nu sunt caracterizați, este necesar ca aditivii respectivi să se specifice clar și, în raportul de testare, să se prezinte date privind compoziția, în special conținutul de carbon, deoarece acesta poate contribui la hrana furnizată. Se recomandă determinarea concentrației de carbon organic total (COT) și a consumului chimic de oxigen (CCO) la prepararea amestecului de aditivi organici și să se efectueze o estimare a contribuției rezultate la COT/CCO în mediul de testare. De asemenea, se recomandă ca valorile COT în mediu (și anume, înainte de adăugarea algelor) să fie mai mici de 2 mg/l (9).

Atunci când se testează substanțe chimice cu conținut de metale, este important să se admită că proprietățile mediului de testare (de exemplu, duritatea, capacitatea de chelatizare) ar putea avea legătură cu toxicitatea substanței studiate. Din acest motiv, este de preferat un mediu bine caracterizat. Cu toate acestea, în prezent, singurele medii bine caracterizate care se cunosc ca fiind optime pentru cultura pe termen lung a *Daphnia magna* sunt Elendt M4 și M7. Ambele medii conțin agentul de chelatizare EDTA. Cercetările (2) arată că „toxicitatea aparentă” a cadmiului este în general mai mică atunci când testul de reproducere se realizează în mediile M4 și M7 decât în mediile cu conținut de EDTA. Prin urmare, M4 și M7 nu se recomandă pentru testarea substanțelor chimice ce conțin metale și se evită, de asemenea, utilizarea altor medii ce conțin agenți de chelatizare cunoscuți. Pentru substanțele cu conținut de metale, se poate recomanda utilizarea unui mediu alternativ precum, de exemplu, apa dură proaspătă reconstituită conform ASTM (9) care nu conține EDTA. Combinația de apă dură proaspătă reconstituită conform ASTM și extract de plante de mare este potrivită pentru cultura pe termen lung a *Daphnia magna* (2).

Concentrația oxigenului dizolvat trebuie să fie mai mare de 3 mg/l la începutul și în timpul testului. PH-ul trebuie să aibă valori în intervalul 6-9 și, în mod normal, nu trebuie să varieze cu mai mult de 1,5 unități în oricare din teste. Se recomandă o duritate mai mare de 140 mg/l (exprimată în CaCO₃). Testele efectuate la această valoare și la valori mai mari au demonstrat o performanță a reproducerii conformă cu criteriile de validitate (11) (12).

Soluții de testat

Se prepară, de regulă, soluții de testat în concentrațiile alese prin diluarea unei soluții stoc. Soluțiile mamă se prepară de preferință, fără utilizarea oricăror solvenți sau agenți de dispersie, dacă este posibil, prin amestecarea sau agitarea substanței chimice de testat în mediul de testat utilizând mijloace mecanice precum agitarea, amestecarea sau ultrasonarea sau alte metode adecvate. Este de preferat să se expună sistemele de testat la concentrații ale substanței chimice de testat care urmează să fie utilizate în studiu atât timp cât este necesar pentru a demonstra menținerea concentrațiilor de expunere stabile înainte de introducerea organismelor de testat. În cazul în care substanța chimică de testat se dizolvă greu în apă, se urmează procedurile descrise în Orientările OCDE pentru manipularea substanțelor dificile (13). Se evită utilizarea solvenților sau a agenților de dispersie, dar aceasta poate fi necesară în anumite cazuri pentru a produce o soluție stoc cu o concentrație corespunzătoare de dozare.

O apă de diluție martor cu replici adecvate și, dacă nu se poate evita, un solvent martor cu replici adecvate se efectuează în plus față de concentrațiile de testare. Numai solvenții sau agenții de dispersie care au fost investigați a nu avea efecte semnificative sau a avea doar efecte minime asupra variabilei de răspuns se utilizează în test. La referința (13) se furnizează exemple de solvenți adecvați (de exemplu, acetona, etanolul, metanolul, dimetilformamida și trietilen glicolul) și agenți de dispersie (de exemplu Cremophor RH40, metilceluloza 0,01 % și HCO-40). În cazul în care se utilizează un solvent sau agent de dispersie, concentrația finală a acestuia nu trebuie să depășească 0,1 ml/l (13) și trebuie să fie aceeași concentrație în toate vasele de testare, cu excepția martorului de apă de diluție. Cu toate acestea, se depun toate eforturile pentru a menține la minimum concentrația solventului.

PROCEDURĂ

Condiții de expunere

Durată

Durata testului este de 21 de zile.

Încărcarea

Animalele părinți se țin individual, câte unul pentru fiecare vas de testare, de regulă cu 50100 ml (pentru *Daphnia magna*, pot fi posibile volume mai mici, în special pentru dafniile mai mici, de exemplu, *Ceriodaphnia dubia*) de mediu în fiecare vas de testare, cu excepția cazului în care un model de testare în flux continuu este necesar pentru testare.

Uneori, ar putea să fie necesare volume mai mari pentru a satisface condițiile procedurii analitice utilizate pentru determinarea concentrației substanței chimice de testat, cu toate că reunirea replicilor pentru analiza chimică este permisă, de asemenea. În cazul în care se utilizează volume mai mari de 100 ml, rația furnizată pentru dafnia ar putea necesita creștere pentru a asigura disponibilitatea alimentației adecvate și respectarea criteriilor de validitate.

Animalele de experiență

Pentru teste semistatice, sunt necesare cel puțin 10 animale ținute fiecare la fiecare concentrație de testat și cel puțin 10 animale ținute fiecare în seria martor.

Pentru testele în flux continuu, s-a dovedit că sunt necesare 40 de animale împărțite în patru grupe de câte 10 animale pentru fiecare concentrație de testat (1). Se pot utiliza mai puține organisme de testat și se recomandă un minimum de 20 de animale per concentrație, împărțite în două sau mai multe replici cu un număr egal de animale (de exemplu patru replici, fiecare cu câte cinci dafnii). De reținut faptul că, pentru testele în care animalele sunt ținute în grupe, nu va fi posibil să se excludă descendenții de la analiza statistică în cazul în care se produce mortalitatea parentală inadvertentă/accidentală atunci când reproducerea a început și, prin urmare, în aceste cazuri, capacitatea de reproducere se exprimă în numărul total de descendenți vii produși per părinte prezent la începutul testului.

Tratamentele se repartizează tuturor vaselor de testat și toată manipularea ulterioară a vaselor de testat se face în mod aleatoriu. Nerespectarea acestui principiu poate să aducă prejudicii care pot fi interpretate ca fiind un efect al concentrației. În special, dacă unitățile experimentale sunt manipulate în ordinea tratamentului sau a concentrației, atunci unele efecte care depind de timp, cum ar fi oboseala operatorului sau altă eroare, ar putea să genereze efecte mai mari la concentrații mai mari. În plus, dacă există posibilitatea ca rezultatele testului să fie influențate de o condiție inițială sau de mediu a testului, precum poziția în laborator, atunci se ia în vedere blocarea testului.

Hrănirea

Pentru testele semistatice, hrana se administrează de preferință zilnic, dar cel puțin de trei ori pe săptămână (și anume, corespunzător modificărilor mediilor). Se ia în considerare posibila diluare a concentrațiilor de expunere prin adăugarea de produse alimentare și se evită cât mai mult posibil în cazul suspensiilor de alge bine concentrate. Se consemnează orice abatere de la această regulă (de exemplu, pentru testele în flux continuu).

Pe durata testului, hrana animalelor părinți este alcătuită, de preferință, din celule de alge vii din una sau mai multe dintre următoarele specii: sp. *Chlorella*, *Pseudokirchneriella subcapitata* (înainte *Selenastrumcapricornutum*) și *Desmodesmus subspicatus* (înainte *Scenedesmus subspicatus*). Regimul alimentar se bazează pe cantitatea de carbon organic (C) administrat pentru fiecare animal părinte. Cercetările (14) au arătat că, pentru *Daphnia magna*, rațiile cuprinse între 0,1 și 0,2 mg C/dafnia/zi sunt suficiente pentru obținerea numărului necesar de descendenți care să satisfacă criteriile de validitate a testului. Rația se poate administra fie sub forma unei rate constante pe toată perioada testului sau, dacă se dorește, se administrează o porție mai mică la început și apoi se crește în timpul testului, ținând cont de creșterea animalelor părinți. În acest caz, rația trebuie să rămână totuși în valorile recomandate de 0,1-0,2 mg C/dafnia/zi tot timpul.

În cazul în care urmează să se utilizeze măsuri înlocuitoare, de exemplu, numărul de celule de alge sau absorbanța luminii, la administrarea rației (și anume, pentru ușurință, deoarece măsurarea conținutului de carbon durează mult), fiecare laborator trebuie să-și realizeze propria nomogramă referitoare la măsura înlocuitoare pentru conținutul de carbon al culturii de alge (a se vedea appendicele 3 pentru recomandarea privind realizarea nomogramei). Nomogramele se verifică cel puțin anual și mai frecvent dacă au fost schimbate condițiile de cultură ale algelor. S-a constatat că absorbanța luminii este un înlocuitor mai bun pentru conținutul de carbon decât numărul de celule (15).

Pentru a minimiza volumul mediului de cultură de alge transferat în vasele de testare se administrează o suspensie de alge concentrată pentru dafnia. Concentrația de alge se poate obține prin centrifugare urmată de resuspensie în mediu de cultură pentru dafnia.

Lumină

16 ore de lumină la o intensitate de maximum $15-20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ măsurată la suprafața apei vasului. În cazul instrumentelor de măsurare a luminii calibrate în lucși, un interval echivalent de 1000-1500 lucși pentru lumină albă rece corespunde aproximativ intensității luminoase recomandate $15-20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Temperatura

Temperatura mediilor de testare trebuie să fie cuprinsă între valorile 18- 22 °C. Cu toate acestea, pentru niciun test temperatura nu trebuie să varieze, dacă se poate, cu mai mult de 2 °C în limitele specificate (de exemplu 18-20, 19-21 sau 20-22 °C). Utilizarea unui vas de testare suplimentar ar putea să fie necesară pentru urmărirea temperaturii.

Aerarea

Vasele de testare nu se aerează în timpul testului.

Modelul testului

Testul de stabilire a intervalului

Atunci când este necesar, se desfășoară un test de stabilire a intervalului cu, de exemplu, cinci concentrații de substanță chimică de testat și două replici pentru fiecare tratament și martor. Informații suplimentare, obținute din testele cu substanțe chimice similare sau din literatura de specialitate, privind toxicitatea acută pentru dafnie și/sau alte organisme acvatice pot fi utile, de asemenea, pentru a lua decizii cu privire la intervalul de concentrații care urmează să fie utilizate în testul de stabilire a intervalului.

Durata testului de stabilire a intervalului este de 21 de zile sau o perioadă suficientă de a estima în mod fiabil nivelurile de efecte. La sfârșitul testului, se evaluează reproducerea dafniei. Se înregistrează numărul părinților și apariția descendenților.

Testul definitiv

În mod normal, trebuie să existe cel puțin cinci concentrații de testat care să delimiteze concentrația efectivă (de exemplu, CE_x) și aranjate într-o serie geometrică cu un factor de separare, de preferință, de maximum 3,2. Se utilizează un număr adecvat de replici pentru fiecare concentrație de testat (a se vedea punctele 24-25). Utilizarea a mai puțin de cinci concentrații trebuie justificată. Substanțele chimice nu se testează la concentrații mai mari decât limita de solubilitate a acestora în mediul de testare. Înainte de a desfășura experimentul, este necesar să se ia în considerare puterea statistică a modelelor de testare și utilizarea de metode statistice adecvate (4). La stabilirea intervalului de concentrații, se rețin următoarele:

- (i) Atunci când se estimează CE_x pentru efectele asupra reproducerii, se recomandă utilizarea unor concentrații suficiente pentru stabilirea CE_x cu un nivel corespunzător de încredere. Concentrațiile de testat utilizate trebuie să delimiteze, de preferință, CE_x estimat astfel încât CE_x să fie determinat prin interpolare, mai degrabă decât prin extrapolare. Mai multe concentrații de testare (de exemplu, 10) și mai puține replici pentru fiecare concentrație (de exemplu, 5, astfel menținând constant numărul total de vase) și cu 10 martori este un avantaj pentru următoarele analize statistice.
- (ii) Pentru estimarea CME0 și/sau CFEO, concentrația cea mai mică de testare trebuie să fie suficient de mică, astfel încât capacitatea de reproducere la concentrația respectivă să nu fie cu mult mai mică decât cea din martor. În cazul în care nu se întâmplă acest lucru, testul se repetă cu concentrația cea mai mică redusă.
- (iii) Pentru estimarea CME0 și/sau CFEO, cea mai mare concentrație de testare trebuie să fie suficient de mare încât capacitatea de reproducere la concentrația respectivă să fie cu mult mai mică decât cea din martor. În cazul în care nu se întâmplă acest lucru, testul se repetă cu concentrația cea mai mare sporită, cu excepția cazului în care concentrația maximă de testare necesară pentru testarea efectelor cronice (și anume, 10 mg/l) a fost utilizată ca cea mai mare concentrație de testat în testul inițial.

În cazul în care nu se observă efecte la cea mai mare concentrație în testul de stabilire a intervalului (de exemplu, la 10 mg/l) sau atunci când substanța chimică de testat are foarte probabil un nivel redus/fără toxicitate pe baza lipsei de toxicitate de la alte organisme și/sau un nivel scăzut/fără absorbție, testul de reproducere poate fi efectuat ca un test limită, utilizând o concentrație de testare, de exemplu, de 10 mg/l și martorul. Se utilizează zece replici atât pentru grupul de tratament, cât și pentru grupul martor. Atunci când un test limită ar putea necesita să fie efectuat într-un sistem în flux continuu, ar fi adecvat un număr mai mic de replici. Un test limită va oferi posibilitatea de a demonstra că nu există niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic la concentrația limită, dar în cazul în care se înregistrează efecte, se solicită, în mod normal, o testare completă.

Controale

În plus față de seria pentru test, se realizează o serie de probe martor pentru mediul de testare și, de asemenea, dacă este relevant, o serie de probe martor care conțin solventul sau agentul de dispersie. Atunci când se utilizează, concentrația solventului sau agentului de dispersie trebuie să fie egală cu cea utilizată în vasele ce conțin substanța chimică de testat. Se utilizează un număr corespunzător de replici (a se vedea punctele 23-24).

În general, într-un test bine realizat, coeficientul de variație în jurul numărului mediu de descendenți vii obținuți per animal părinte în martor (martori) este $\leq 25\%$ și acest lucru se consemnează în modelele testului care utilizează animale ținute separat.

Reînnoirea mediului de testare

Frecvența reînnoirii mediului de testare depinde de stabilitatea substanței de testat, dar trebuie să fie de cel puțin trei ori pe săptămână. În cazul în care, din testele preliminare de stabilitate (a se vedea punctul 7), concentrația substanței chimice de testat nu este stabilă (și anume, nu se încadrează în intervalul 80-120 %) din valoarea nominală sau este mai mică de 80 % din concentrația inițială măsurată) în perioada maximă de reînnoire (și anume, trei zile), se ia în considerare o reînnoire mai frecventă a mediului sau utilizarea unui test în flux continuu.

Atunci când un mediu este reinnoit în teste semistatice, se pregătește o a doua serie de vase de testat și animalele părinți se transferă în acestea cu ajutorul, de exemplu, al unei pipete de sticlă cu un diametru potrivit. Volumul mediului transferat cu *Daphnia* trebuie să fie minim.

Observații

Rezultatele observațiilor efectuate în timpul testului se consemnează în fișe tehnice (a se vedea exemple în apendicele 4 și 5). În cazul în care sunt necesare alte măsurători (a se vedea punctul 44), ar putea să fie necesare observații suplimentare.

Descendenți

Descendenții produși de fiecare animal părinte se îndepărtează, de preferință, și se numără zilnic de la apariția primilor pui, pentru a preveni ca aceștia să consume hrana destinată părinților. În sensul acestei metode, se numără numai numărul de descendenți vii, dar se consemnează și prezența ouălor avortate sau a descendenților decedați.

Mortalitate

Mortalitatea în rândul animalelor părinți se înregistrează, de preferință, zilnic sau cel puțin la fel de frecvent ca numărarea descendenților.

Alți parametri

Cu toate că această metodă de testare este destinată în principal evaluării efectelor asupra capacității de reproducere, este posibil să se poată măsura, de asemenea, alte efecte suficiente pentru a permite o analiză statistică. Capacitatea de reproducere per animal părinte supraviețuitor, și anume numărul de descendenți în viață produși per părinte supraviețuitor în timpul testării, poate fi înregistrată. Aceasta poate fi comparată cu principala variabilă de răspuns (capacitatea de reproducere per animal părinte în momentul începerii testului care nu a decedat din cauze inadvertente sau accidentale în timpul testului). În cazul în care se produce mortalitate parentală la replicile expuse, se ia în considerare dacă mortalitatea urmează sau nu un tipar concentrație-răspuns, de exemplu, în cazul în care există o regresie semnificativă a răspunsului în funcție de concentrația substanței chimice de testat cu o pantă pozitivă (un test statistic precum testul de stabilire a tendinței Cochran-Armitage poate fi utilizat în acest sens). În cazul în care mortalitatea nu urmează un tipar concentrație-răspuns, atunci se exclud din analiza rezultatelor testului acele replici cu mortalitate parentală. În cazul în care mortalitatea urmează un tipar concentrație-răspuns, mortalitatea parentală se atribuie ca un efect al substanței chimice de testat și replicile nu se exclud din analiza rezultatelor testului. Măsurătorile de creștere sunt deosebit de recomandate, având în vedere faptul că acestea furnizează date privind posibilele efecte subletale, care ar putea să fie mai utile decât determinarea numai a reproducerii; se recomandă măsurarea lungimii animalelor părinți (și anume, lungimea corpului, fără spin anal) la sfârșitul testului. Alți parametri care se pot măsura sau calcula includ timpul până la producerea primului pui (și a puilor ulteriori), numărul și dimensiunea puilor per animal, numărul de pui avortați, prezența masculilor nou-născuți (OCDE, 2008) sau ephippia și posibil rata intrinsecă a creșterii populației (a se vedea apendicele 1 pentru definiție și apendicele 7 pentru identificarea sexului nou-născuților).

Frecvența determinărilor analitice și a măsurătorilor

Este necesar să se măsoare concentrația oxigenului, temperatura, duritatea și valorile pH-ului cel puțin o dată pe săptămână, în mediile proaspete și cele vechi, în proba (probele) martor și în concentrațiile cele mai mari de substanță chimică de testat.

În timpul testului, se determină concentrațiile substanței chimice de testat la intervale regulate.

În testele semistatice în cadrul cărora se estimează o menținere a concentrației substanței chimice de testat în limitele de ± 20 la sută din cea nominală (și anume, în intervalul de 80-120 la sută – a se vedea punctele 6, 7 și 39), se recomandă analizarea cel puțin a celei mai mari și a celei mai mici concentrații de testare, atunci când soluțiile sunt proaspăt preparate și când sunt reinnoite în timpul primei săptămâni de testare (și anume, analizele se realizează pe o probă din aceeași soluție – atunci când este proaspăt preparată și la reinnoire). Ulterior, se repetă aceste determinări la intervale de cel puțin o săptămână.

În cazul testelor în care nu se estimează menținerea concentrației substanței chimice de testat în limitele de ± 20 la sută din cea nominală, este necesară analizarea tuturor concentrațiilor de testare atunci când soluțiile sunt proaspăt preparate și la reînnoire. Cu toate acestea, în cazul testelor în care concentrația inițială măsurată a substanței chimice de testat nu se situează în limitele de ± 20 la sută din cea nominală, dar se pot aduce dovezi care să indice repetabilitatea și stabilitatea concentrațiilor inițiale (și anume, în intervalul de 80-120 la sută din concentrațiile inițiale), determinările chimice se pot reduce în săptămânile 2 și 3 de testare, la cea mai mare și cea mai mică concentrație de testare. În toate cazurile, este necesar să se determine concentrațiile substanței chimice de testat înaintea reînnoirii doar la un vas replică pentru fiecare concentrație de testare.

În cazul în care se utilizează un test cu flux continuu, se recomandă un regim de prelevare a probelor similar cu cel descris pentru testele semistatice (dar măsurarea soluțiilor „vechi” nu se aplică în acest caz) Cu toate acestea, ar putea fi recomandabil să se crească numărul prelevărilor de probe în prima săptămână (de exemplu, trei seturi de măsurători) pentru a asigura menținerea stabilității concentrațiilor de testare. La aceste tipuri de testări, se verifică zilnic debitul diluantului și al substanței chimice de testat.

În cazul în care se poate dovedi menținerea satisfăcătoare, pe toată durata testului a concentrației substanței chimice testate în limitele de ± 20 la sută din cea nominală sau măsurată inițial, atunci rezultatele se pot obține din valoarea nominală sau din cea măsurată inițial. În cazul în care abaterea de la concentrația nominală sau cea măsurată inițial este mai mare de ± 20 la sută, este necesar ca rezultatele să se exprime în funcție de media ponderată în timp (a se vedea orientările pentru calculul din apendicele 6).

DATE ȘI RAPORTARE

Interpretarea rezultatelor

Scopul acestui test este determinarea efectului unei substanțe chimice de testat asupra capacității de reproducere. Numărul total de descendenți în viață per animal părinte se calculează pentru fiecare vas de testare (și anume, replică). În plus, reproducerea poate fi calculată pe baza producției de descendenți în viață de către organismul părinte supraviețuitor. Cu toate acestea, cea mai relevantă variabilă de răspuns din punct de vedere ecologic este numărul total de descendenți în viață produși per animal părinte care nu mor în mod accidental ⁽¹⁾ sau în mod inadvertent ⁽²⁾ în timpul testului. În cazul în care animalul părinte moare în timpul testului în mod accidental sau inadvertent sau se dovedește a fi mascul, replica se exclude din analiză. Analiza se va efectua ulterior pentru un număr redus de replici. În cazul în care se produce mortalitate parentală la replicile expuse, se ia în considerare dacă mortalitatea urmează sau nu un tipar concentrație-răspuns, de exemplu, în cazul în care există o regresie semnificativă a răspunsului în funcție de concentrația substanței chimice de testat cu o pantă pozitivă (un test statistic precum testul de stabilire a tendinței Cochran-Armitage poate fi utilizat în acest sens). În cazul în care mortalitatea nu urmează un tipar concentrație-răspuns, se exclud din analiza rezultatelor testului acele replici cu mortalitate parentală. În cazul în care mortalitatea urmează un tipar concentrație-răspuns, mortalitatea parentală se atribuie ca un efect al substanței chimice de testat și replicile nu se exclud din analiza rezultatelor testului.

Rezumând, atunci când CMEO și CFEO sau CE_x sunt utilizate pentru a exprima efectele, se recomandă să se calculeze efectul asupra reproducerii prin utilizarea ambelor variabile de răspuns menționate mai sus, și anume

- ca numărul total de descendenți în viață produși per animal părinte care nu mor în mod accidental sau în mod inadvertent în timpul testului și;
- ca numărul de descendenți în viață produși per animal părintelui supraviețuitor;

și ulterior să se utilizeze ca rezultat final cea mai scăzută CFEO și CMEO sau valoarea E/CE_x calculate prin utilizarea oricărei dintre aceste două variabile de răspuns.

Înainte de utilizarea analizei statistice, de exemplu, proceduri ANOVA, compararea tratamentelor asupra martorilor prin testul-t student, testul Dunnett, testul Williams, testul Jonckheere-Terpstra regresiv, se recomandă luarea în considerare a transformării datelor în cazul în care acest lucru este necesar pentru îndeplinirea cerințelor unui anumit test statistic. În ceea ce privește alternativele neparametrice, se pot lua în considerare testele Dunn sau Mann-Whitney. Intervale de încredere de 95 % sunt calculate pentru mediile tratamentelor individuale.

⁽¹⁾ Mortalitate accidentală: mortalitate care nu este legată de substanța chimică cauzată de un incident accidental (și anume, cauză cunoscută)

⁽²⁾ Mortalitate inadvertentă: mortalitate care nu este legată de substanța chimică fără o cauză cunoscută

Numărul părinților supraviețuitori în martorii netratați este un criteriu de validitate și se documentează și se raportează. De asemenea, se raportează în raportul final toate celelalte efecte dăunătoare, de exemplu comportamentul anormal și constatările semnificative din punct de vedere toxicologic.

CEx

Valorile CEx, inclusiv limitele de încredere inferioară și superioară ale acestora, sunt calculate utilizând metode statistice adecvate (de exemplu, funcția logistică sau Weibull, metoda simplificată Spearman-Kärber sau interpolarea simplă). Pentru a calcula CE₁₀, CE₅₀ sau orice altă CEx se supune analizei de regresie întregul set de date.

CFO/CMO

În cazul în care o analiză statistică are ca scop determinarea CFO/CMO se utilizează metode statistice adecvate în conformitate cu documentul 54 al OCDE intitulat „Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application” (Abordări actuale privind analiza statistică a datelor de ecotoxicitate: orientări pentru aplicare) (4). În general, se investighează efectele adverse ale substanței chimice de testat în comparație cu proba martor prin testarea unei ipoteze unilaterale la $p \leq 0,05$.

Distribuția normală și omogenitatea varianței pot fi testate utilizând un test statistic corespunzător, de exemplu, testul Shapiro-Wilk și, respectiv, testul Levene ($p \leq 0,05$). Se poate efectua testul ANOVA unilateral sau teste multicomparative ulterioare. Comparații multiple (de exemplu, testul Dunnett) sau testele de stabilire a tendințelor (de exemplu, testul Williams sau testul Jonckheere-Terpstra regresiv) pot fi utilizate pentru a calcula dacă există diferențe semnificative ($p \leq 0,05$) între martori și diferitele concentrații de substanță chimică de testat [selecția testului recomandat, în conformitate cu documentul de orientare nr. 54 al OCDE (4)]. În caz contrar, se pot utiliza metode neparametrice (de exemplu, testul U Bonferroni conform Holm sau testului de stabilire a tendinței Jonckheere-Terpstra) pentru a determina CFO și CMO.

Test limită

În cazul în care a fost efectuat un test limită (compararea martorului și un singur tratament) și se îndeplinesc condițiile prealabile ale procedurii de testare parametrică (normalitate, omogenitatea), răspunsurile metrice pot fi evaluate prin intermediul testului Student (test t). Se poate utiliza un test t al varianței inegale (precum testul Welch) sau un test neparametric precum Mann-Whitney-U, în cazul în care aceste cerințe nu sunt îndeplinite.

Pentru a determina diferențele semnificative dintre martori (martor și solvent sau martor de dispersie), se pot testa replicile fiecărui martor astfel cum este descris pentru testul limită. În cazul în care aceste teste nu detectează diferențe semnificative, se pot reuni toți martorii și replicile martor tratate cu solvent. În caz contrar, se compară toate tratamentele cu martorul tratat cu solvent.

Raport de testare

Raportul de testare include următoarele:

Substanța chimică de testat:

- natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante;
- date de identificare chimică, inclusiv puritatea.

Speciile de testare:

- clonul (dacă a fost caracterizat genetic, astfel încât să corespundă speciei), furnizorul sau sursa (dacă se cunoaște) și condițiile de cultură utilizate. În cazul în care se utilizează o specie diferită de *Daphnia magna*, acest lucru se înregistrează și se justifică.

Condiții de testare:

- procedura de testare utilizată (de exemplu, semistatic sau în flux continuu, volumul, încărcarea în număr de dafnia pe litru);

- fotoperioada și intensitatea luminii;
- modelul testului (de exemplu, numărul de replici, numărul de părinți pentru fiecare replică);
- detalii privind mediul de cultură utilizat;
- adaosurile de material organic, în cazul în care se utilizează, inclusiv compoziția, sursa, metoda de preparare, raportul COT/CCO al preparatelor stoc, determinarea raportului COT/CCO rezultat în mediul de testare;
- informații detaliate privind hrana, inclusiv cantitatea (în mg C/dafnia/zi) și calendarul [de exemplu, tipul alimentului (alimentelor), inclusiv, pentru alge, denumirea specifică (specia) și, dacă se cunoaște, familia, condițiile de cultură];
- metoda de preparare a soluțiilor mamă și frecvența reînnoirii (se menționează solventul sau agentul de dispersie și concentrația acestuia, dacă este cazul).

Rezultate:

- rezultatele oricăror studii preliminare privind stabilitatea substanței chimice de testat;
- concentrațiile de testare nominale și rezultatele tuturor analizelor pentru determinarea concentrației substanței chimice de testat în vasele de testare (a se vedea fișele tehnice din apendicele 5); de asemenea, se raportează eficiența de recuperare a metodei și limita determinării;
- calitatea apei din vasele de testare (și anume, pH, temperatura și concentrația oxigenului dizolvat și COT și/sau CCO și duritatea, dacă este cazul) (a se vedea exemplul de fișă tehnică din apendicele 4);
- fișa completă a producției de descendenți în viață în timpul testului de către fiecare animal părinte (a se vedea exemplul de fișă tehnică din apendicele 4);
- numărul de decese printre animalele părinți și ziua în care au avut loc (a se vedea exemplul de fișă tehnică din apendicele 4);
- coeficientul de variație pentru controlul capacității de reproducere (pe baza numărului total de descendenți în viață per animal părinte în viață la sfârșitul testului);
- reprezentarea grafică a numărului total de descendenți în viață produși per animal părinte în fiecare replică, excluzând orice animal părinte care au murit în mod accidental sau inadvertent în timpul testului în funcție de concentrația substanței chimice de testat;
- după caz, reprezentarea grafică a numărului total de descendenți în viață produși per animal părinte supraviețuitor la fiecare replică în funcție de concentrația substanței chimice de testat
- după caz, concentrația la care se observă cele mai mici efecte (CMEO) pentru reproducere, inclusiv o descriere a metodelor statistice utilizate și o identificare a dimensiunii efectului care ar putea să fie detectat (în acest sens se poate efectua o analiză a puterii înainte de începerea experimentului) și concentrația la care nu se observă niciun efect (CFEO) pentru reproducere; informații cu privire la variabila de răspuns utilizată pentru a calcula valoarea CMEO și CFEO (fie pentru numărul total de descendenți în viață per organism matern care nu a decedat în mod accidental sau inadvertent în timpul testului sau ca numărul total de descendenți în viață per organism matern supraviețuitor), după caz, se raportează, de asemenea, CMEO sau CFEO pentru mortalitatea animalelor părinți;
- dacă este cazul, CE_x pentru reproducere cu intervalele de încredere (de exemplu, 90 % sau 95 %) și reprezentarea grafică a modelului ajustat utilizat pentru calculul acesteia, panta curbei concentrație-răspuns și erorile standard ale acesteia;
- alte efecte biologice observate sau măsurători: se raportează orice alte efecte biologice care au fost observate sau măsurate (de exemplu, creșterea animalelor părinți), inclusiv o justificare corespunzătoare;
- explicarea oricărei abateri de la metoda de testare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.
 - (2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Paris.
 - (3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.
 - (4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.
 - (5) Baird, D.J., *et al.* (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotox. and Environ. Safety*, 21, 257-265.
 - (6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.
 - (7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods
 - (8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, 775-782.
 - (9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. In: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 – 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA
 - (10) Baird, D.J., *et al.* (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.
 - (11) Parkhurst, B.R., J.L. Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, 26: 1-8.
 - (12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. *Arch. Hydrobiol.*, 120(2): 185-196.
 - (13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Paris.
 - (14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 12, 2053-2058.
 - (15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. *Arch. Hydrobiol.*, 128, 459-466.
-

Apendicele 1

DEFINIȚII

În scopul acestei metode de testare, se utilizează următoarele definiții:

Mortalitate accidentală: mortalitate care nu este legată de substanța chimică cauzată de un incident accidental (și anume, cauză cunoscută).

Substanță chimică: o substanță sau un amestec.

Cex: concentrația substanței chimice de testat dizolvată în apă care generează o reducere de x la sută a reproducerii la *Daphnia* într-un timp de expunere stabilit.

Mortalitate inadvertentă: mortalitate care nu este legată de substanța chimică, fără o cauză cunoscută.

Rata intrinsecă de înmulțire: este o măsură a creșterii populației care cuprinde capacitatea de reproducere și mortalitatea specifică vârstei (1) (2) (3). La populațiile în stare staționară, aceasta va fi egală cu zero. La populațiile în creștere, aceasta va fi pozitivă, iar la populațiile în scădere, aceasta va fi negativă. În mod clar, aceasta din urmă nu este sustenabilă și în final va conduce la extincție.

Limita de detecție: este cea mai mică concentrație care se poate detecta, dar nu se poate măsura.

Limita de determinare: este cea mai mică concentrație care se poate determina cantitativ.

Concentrația la care se observă cele mai mici efecte (CMEO): concentrația cea mai mică testată la care se observă un efect important al substanței chimice din punct de vedere statistic asupra reproducerii și mortalității părinților (la $p < 0,05$) în comparație cu martorul, într-o perioadă de expunere stabilită. Cu toate acestea, toate concentrațiile de testare mai mari decât CMEO trebuie să aibă un efect nociv egal cu sau mai mare decât cele observate la CMEO. Atunci când cele două condiții menționate nu pot fi satisfăcute, se prezintă o explicație completă a modului de selectare a CMEO (și, prin urmare, CFEO).

Mortalitate: un animal se înregistrează ca mort atunci când este imobil, și anume atunci când nu poate să înoate sau dacă nu se observă o mișcare a apendicelui sau a post-abdomenului, în 15 secunde de la o ușoară agitare a recipientului de testare. (În cazul în care se utilizează o altă definiție, aceasta se specifică împreună cu sursa bibliografică).

Concentrația la care nu se observă niciun efect (CFEO): concentrația de testare imediat sub CMEO care, în comparație cu martorul, nu are un efect important din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) într-o perioadă de expunere stabilită.

Descendent: exemplarele tinere de *Daphnia* produse de animalele părinți în cursul testului.

Animale părinți: femelele de *Daphnia* prezente la începutul testului și a căror capacitate de reproducere constituie obiectul studiului.

Capacitate de reproducere: numărul de descendenți în viață produși de animalele părinți în perioada de testare.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare de testare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.
- (2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.
- (3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

Apendicele 2

PREPARAREA MEDIILOR ELENDT M7 ȘI M4 COMPLET DETERMINATE

Adaptarea la mediile Elendt M7 și M4

Unele laboratoare au întâmpinat dificultăți la transferul direct al *Daphnia* în mediile M4 (1) și M7. Cu toate acestea, au fost obținute anumite succese printr-o adaptare treptată, și anume, prin mutarea din mediul propriu la 30 % Elendt, apoi 60 % Elendt și ulterior la 100 % Elendt. Poate fi necesar ca perioadele de adaptare să aibă durată de până la o lună.

Pregătire

Microelemente

Se prepară mai întâi soluții mamă separate (I) ale fiecărui microelement în apă de puritate corespunzătoare, de exemplu deionizată, distilată sau purificată prin osmoză inversă. Din soluțiile mamă menționate (I), se prepară o soluție mamă unică (II), care conține toate microelementele (soluție combinată), și anume:

Soluția (soluțiile) mamă I (o singură substanță)	Cantitate adăugată la apă	Concentrație (în funcție de mediul M4)	Pentru prepararea soluției mamă combi- nate II, se adaugă următoarea cantitate de soluție mamă I în apă	
			ml/l	
	mg/l		M4	M7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000 de ori	1,0	0,25
MnCl ₂ •4 H ₂ O	7 210	20 000 de ori	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 de ori	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000 de ori	1,0	0,25
SrCl ₂ •6 H ₂ O	3 040	20 000 de ori	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 de ori	1,0	0,25
Mo Na ₂ O ₄ •2 H ₂ O	1 260	20 000 de ori	1,0	0,25
CuCl ₂ •2 H ₂ O	335	20 000 de ori	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000 de ori	1,0	1,0
CoCl ₂ •6 H ₂ O	200	20 000 de ori	1,0	1,0
KI	65	20 000 de ori	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000 de ori	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000 de ori	1,0	1,0
Na ₂ EDTA•2 H ₂ O	5 000	2 000 de ori	-	-
FeSO ₄ •7 H ₂ O	1 991	2 000 de ori	-	-
Atât soluțiile de Na ₂ EDTA, cât și de FeSO ₄ se prepară separat, se toarnă împreună și se autoclavează imediat. Rezultă:				
Soluție Fe-EDTA		1 000 de ori	20,0	5,0

Mediile M4 și M7

Mediile M4 și M7 se prepară din soluția mamă II, macroelemente nutritive și vitamine, după cum urmează:

	Cantitate adăugată la apă	Concentrație (în funcție de mediul M4)	Cantitatea de soluție mamă adăugată pentru prepararea mediului	
	mg/l		ml/l	
			M4	M7
Soluție mamă II (microelemente combinate)		20 de ori	50	50
Soluții mamă cu macroelemente nutritive (o singură substanță)				
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	293 800	1 000 de ori	1,0	1,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	246 600	2 000 de ori	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 de ori	0,1	0,1
NaHCO_3	64 800	1 000 de ori	1,0	1,0
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	50 000	5 000 de ori	0,2	0,2
NaNO_3	2 740	10 000 de ori	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000 de ori	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 de ori	0,1	0,1
Soluție combinată de vitamine	-	10 000 de ori	0,1	0,1

Soluția mamă combinată de vitamine se prepară prin adăugarea celor 3 vitamine la 1 litru de apă conform indicațiilor prezentate în continuare:

	mg/l			
Clorhidrat de tiamină	750	10 000 de ori		
Cianocobalamină (B_{12})	10	10 000 de ori		
Biotină	7,5	10 000 de ori		

Soluția combinată de vitamine se păstrează înghețată în părți mici. Vitaminele se adaugă în medii cu puțin timp înainte de utilizare.

N.B.: Pentru a evita precipitarea sărurilor în timpul preparării mediilor complete, se adaugă părțile de soluții mamă în aproximativ 500-800 ml apă deionizată și apoi se aduce la un litru.

N.N.B. Prima semnalare a mediului M4 se poate găsi în Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.

Apendicele 3

ANALIZA CONȚINUTULUI DE CARBON ORGANIC TOTAL (COT) ȘI REALIZAREA UNEI NOMOGRAME PENTRU CONȚINUTUL COT DIN HRANA PE BAZĂ DE ALGE

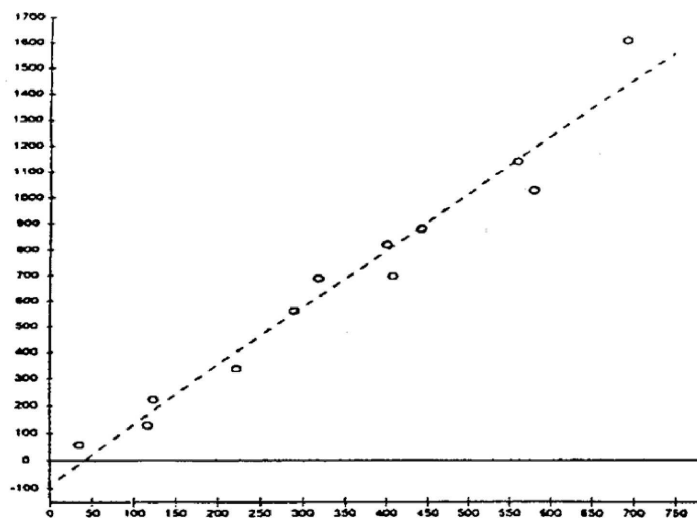
Se acceptă ca măsurarea conținutului de carbon din hrana pe bază de alge să nu se măsoare în mod normal direct, ci din corelările (și anume, nomogramele) cu măsurile înlocuitoare precum numărul celulelor de alge sau absorbanta luminii).

Este necesar ca măsurarea COT să se efectueze mai degrabă prin oxidare la temperatură mare decât prin metodele UV sau cu persulfat. (Pentru consultanță, a se vedea: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Pentru obținerea nomogramelor, algele se separă din mediul de cultură prin centrifugare urmată de resuspensie în apă distilată. Se determină parametrul înlocuitor și concentrația COT în fiecare probă de trei ori. Se analizează probele martor în apă distilată și concentrația COT se scade din concentrația COT din proba de alge.

Nomogramele trebuie să fie liniare în intervalul necesar de concentrații ale carbonului. Exemple sunt prezentate în continuare.

NB: Acestea nu se utilizează pentru conversiune; este esențial ca laboratoarele să-și elaboreze propriile nomograme.



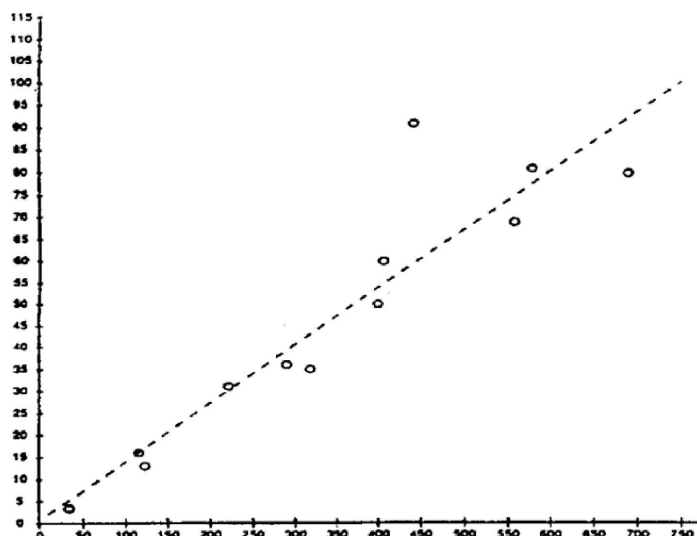
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regresie a mg/l greutate uscată pe mg C/l. Datele din suspensiile concentrate de celule cultivate în loturi semicontinue, resuspendate în apă distilată în apă.

axa x: mg C/l hrană concentrată din alge

axa y: mg/l greutate uscată de hrană concentrată din alge

Coefficient de corecție – 0,980



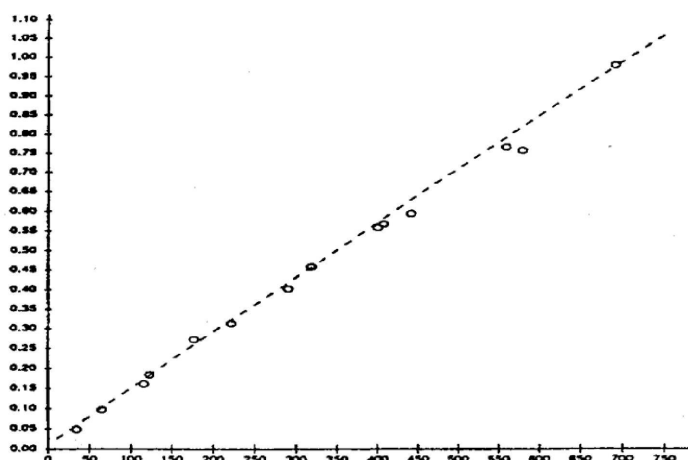
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regresia numărului de celule pe mg C/l. Datele din suspensiile concentrate de celule cultivate în loturi semicontinue, resuspendate în apă distilată în apă.

axa x: mg C/1 hrană concentrată din alge

axa y: Nr. celule/1 hrană concentrate din alge

Coefficient de corecție – 0,926



Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regresia absorbanței pe mg C/l (1 cm lungime traseului). Datele din suspensiile concentrate de celule cultivate în loturi semicontinue, resuspendate în apă distilată în apă.

axa x: mg C/1 hrană concentrată din alge

axa y: Absorbanța la 440 nm pentru o diluție de 1/10 a hranei concentrate din alge

Coefficient de corecție – 0,998

EXEMPLU DE FIȘĂ TEHNICĂ PENTRU ÎNREGISTRAREA INFORMAȚIILOR PRIVIND REÎNNOIREA MEDIULUI, DATELE CONTROLULUI FIZIC/CHIMIC, ADMINISTRAREA HRANEI, REPRODUCEREA DAFNIEI ȘI MORTALITATEA PARENTALĂ

Nr. experiment:	Început la data:					Clon:				Mediu:				Tipul hranei:				Substanța chimică de testat:				Conc. nominală:		
Ziua	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Reînnoirea mediului (se bifează)																								
pH (*)																								nou
																								vechi
O ₂ (mg/l) (*)																								nou
																								vechi
Temperatura (°C) (*)																								nou
																								vechi
Hrana administrată (se bifează)																								
Nr. descendenți în viață (se bifează) (**)																								Total
Vasul 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																								Total
Moartea cumulativă a părinților (***)																								

(*) Se indică vasul care a fost utilizat pentru experiment

(**) Puii avortați se înregistrează cu „AB” în căsuța relevantă

(***) Se înregistrează mortalitatea oricăror animale părinți cu „M” în căsuța relevantă

Apendicele 6

CALCULAREA MEDIEI PONDERATE DE TIMP

Media ponderată de timp

Având în vedere faptul că concentrația substanței chimice de testat poate să scadă în intervalul de timp dintre reînnoiri, este necesar să se aibă în vedere necesitatea alegerii unei concentrații reprezentative pentru domeniul de concentrații experimentate de părintele *Daphnia*. Alegerea se face pe bază de principii biologice, precum și statistice. De exemplu, dacă se consideră că reproducerea este afectată cel mai mult de concentrația de vârf experimentată, atunci se utilizează concentrația maximă. Cu toate acestea, dacă se consideră că efectul acumulat sau pe termen lung al substanței chimice toxice este mai important, atunci o concentrație medie este mai relevantă. În cazul respectiv, o medie potrivită pentru utilizare este concentrația medie ponderată de timp, întrucât aceasta ia în considerare variația concentrației instantanee în timp.

Figura 1

Exemplu de medie ponderată de timp

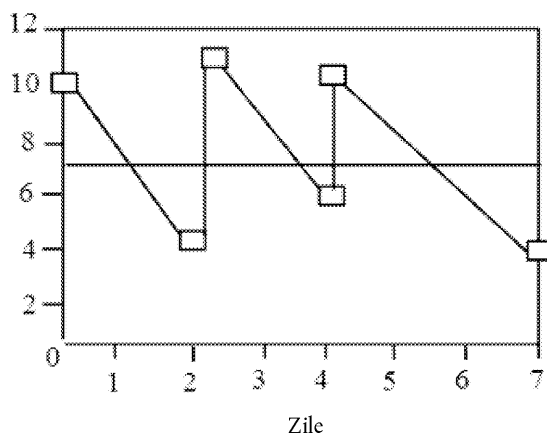


Figura 1 prezintă un exemplu de test (simplificat) cu durată de șapte zile cu reînnoirea mediului în zilele 0, 2 și 4.

- Linia subțire în zig-zag reprezintă concentrația în orice punct în timp. Se consideră că scăderea concentrației este urmarea unui proces de descompunere exponențială.
- Cele șase puncte reprezentate grafic arată concentrațiile observate, măsurate la începutul și la sfârșitul fiecărei perioade de reînnoire.
- Linia continuă groasă indică poziția mediei ponderate de timp.

Media ponderată de timp se calculează, astfel încât aria de sub media ponderată de timp să fie egală cu aria de sub curba concentrațiilor. Calculul pentru exemplul anterior se prezintă în tabelul 1.

Tabelul 1

Calculul mediei ponderate de timp

Reînnoire Nr.	Zile	Conc. 0	Conc. 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Arie
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544

Reînnoire Nr.	Zile	Conc. 0	Conc. 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Arie
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Total zile:		7			Arie totală:	50,092
					Media PT:	7,156

„Zile” este numărul de zile din perioada de reînnoire.

„Conc 0” este concentrația măsurată la începutul fiecărei perioade de reînnoire.

„Conc 1” este concentrația măsurată la sfârșitul fiecărei perioade de reînnoire.

„Ln(Conc 0)” este logaritmul natural al Conc 0.

„Ln (Conc 1)” este logaritmul natural al Conc 1.

„Aria” este aria de sub curba exponențială pentru fiecare perioadă de reînnoire. Se calculează cu:

$$Aria = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times Zi$$

Media ponderată de timp („media PT”) este „Aria totală” împărțită la „Total zile”.

Desigur, pentru testul de reproducere al *Daphnia*, tabelul trebuie mărit până la 21 de zile.

Este clar că, atunci când observațiile se fac numai la începutul și sfârșitul fiecărei perioade de reînnoire, nu se poate confirma că procesul de descompunere este, de fapt, exponențial. O curbă diferită ar genera un calcul diferit pentru „Arie”. Cu toate acestea, un proces de descompunere exponențială nu este neverosimil și este probabil cea mai bună curbă de utilizat în absența altor date.

Este necesară însă o oarecare precauție în cazul în care analiza chimică nu reușește să identifice nicio substanță chimică la sfârșitul perioadei de reînnoire. Cu excepția cazului în care este posibil să se estimeze rapiditatea dispariției substanței chimice din soluție, este imposibil să se obțină o arie realistă sub curbă și, prin urmare, este imposibil să se obțină o medie ponderată de timp rezonabilă.

Apendicele 7

ORIENTĂRI PENTRU IDENTIFICAREA SEXULUI NOU-NĂSCUTULUI

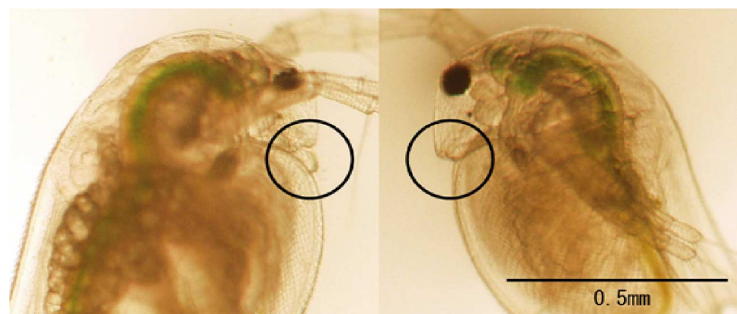
Producția de nou-născuți masculi poate avea loc în condiții de mediu modificate, cum ar fi scurtarea fotoperioadei, temperatura, scăderea concentrației de alimente și mărirea densității populației (Hobaek and Larson, 1990; Kleiven *et al.*, 1992). Producția masculilor de asemenea, este un răspuns cunoscut la anumiți regulatori de creștere a insectelor (Oda *et al.*, 2005). În condițiile în care factori de stres chimici determină o scădere a reproducerii descendenților de la femelele partenogenice, se preconizează un număr sporit de masculi (OCDE, 2008). Pe baza informațiilor disponibile, nu este posibil să se estimeze care dintre raportul dintre sexe sau parametrul de reproducere va fi mai sensibil; cu toate acestea, există indicații (referința „raport de validare”, partea 1) că o creștere a numărului de masculi ar putea fi mai puțin sensibilă decât descreșterea descendenților. Întrucât obiectivul principal al metodei de testare este evaluarea numărului de descendenți produși, apariția masculilor este o observație opțională. În cazul în care acest parametru opțional este evaluat în cadrul unui studiu, se utilizează un criteriu suplimentar de validare a testului de nu mai mult de 5 % masculi în probele martor.

Modul cel mai practic și ușor de a diferenția sexul *Daphnia* este prin utilizarea caracteristicilor fenotipice ale acestora, având în vedere faptul că masculii și femele sunt identice din punct de vedere genetic și sexul acestora este determinat de mediu. Masculii și femelele sunt diferiți în ceea ce privește lungimea și morfologia primelor antene, care la masculi sunt mai lungi decât la femele (figura 1). Această diferență poate fi recunoscută imediat după naștere, cu toate că, pe măsură ce aceștia cresc, se dezvoltă alte caracteristici sexuale secundare (de exemplu, a se vedea figura 2 în Olmstead și LeBlanc, 2000).

Pentru a observa sexul în mod morfologic, se transferă nou-născuții produși de fiecare animal de experiență cu o pipetă și se introduc într-o placă Petri cu mediu de testare. Mediul este menținut la un nivel minim pentru a limita deplasarea animalelor. Observarea primelor antene se poate realiza cu ajutorul unui stereomicroscop ($\times 10-60$).

Fig. 1

Mascul de 24 de ore (stânga) și femelă (dreapta) de *D. magna*. Masculii pot fi diferențiați de femele în funcție de lungimea și morfologia primelor antene, astfel cum se arată în cercuri (Tatarazako *et al.*, 2004).



REFERINȚE

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174.

OCDE, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, 439-449."

(18) În Partea C capitolul C.29, punctul 66 se înlocuiește cu următorul text:

„66. Un test este considerat valid în cazul în care:

- a) valoarea procentuală medie de degradare din vasele F_C care conțin substanța chimică de referință este $> 60 \%$ în a 14-a zi de incubare; și
- b) cantitatea medie de CAT prezent în probele martor alb F_B la finalul testului este $< 3 \text{ mg C/l}$.

În cazul în care aceste limite nu sunt satisfăcute, se repetă testul cu un inocul din altă sursă și/sau se revizuiesc procedurile utilizate. De exemplu, în cazul în care producția CI martor alb ridicată reprezintă o problemă, se urmărește procedura descrisă la punctele 27-32."

(19) În partea C, se adaugă următoarele capitole:

„C.47 Pești, test de toxicitate în stadii timpurii de viață

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea privind testarea (TG) nr. 210 a OCDE (2013). Testele cu pești în stadii timpurii de viață sunt concepute să definească efectele letale și subletale ale substanțelor chimice asupra stadiilor și speciilor testate. Acestea oferă informații utile pentru estimarea efectelor cronice letale și subletale ale substanțelor chimice asupra altor specii de pești.
2. Orientarea privind testarea nr. 210 se bazează pe o propunere formulată de Regatul Unit, care a fost discutată în cadrul unei reuniuni a experților OCDE convocată la Medmenham (Regatul Unit) în noiembrie 1988 și a fost actualizată în 2013 pentru a reflecta experiența acumulată în utilizarea testului și recomandările formulate în urma unui atelier de lucru al OCDE privind testarea toxicității la pești, desfășurat în septembrie 2010 (1).

PRINCIPIUL TESTULUI

3. Peștii aflați în stadii timpurii de viață sunt expuși la o serie de concentrații ale substanței de testat dizolvată în apă. Sunt preferate condiții de testare dinamică; cu toate acestea, dacă nu este posibil, sunt acceptate, de asemenea, condiții de testare semistatică. Pentru detalii suplimentare, a se consulta documentul de orientare al OCDE privind testarea toxicității acvatică a substanțelor și amestecurilor dificile (2). Testul începe prin așezarea ouălor fertilizate în camere de testare și continuă pentru perioada de timp specifică fiecărei specii necesară pentru ca peștii de control să ajungă în stadiul de alevini. Efectele letale și subletale sunt evaluate și comparate cu valorile probelor de control pentru a determina concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) în vederea stabilirii (i) concentrației la care nu se observă niciun efect (NOEC) și/sau (ii) EC_x (de ex. EC_{10} , EC_{20}) prin folosirea unui model de regresie în vederea estimării concentrației care ar determina o modificare de $x \%$ a efectului măsurat. Raportarea concentrațiilor de efect și a parametrilor relevanți poate depinde de cadrul de reglementare. Concentrațiile de testare trebuie să încadreze EC_x astfel încât EC_x să provină mai degrabă din interpolare decât din extrapolare (a se vedea apendicele 1 pentru definiții).

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA DE TESTARE

4. Substanța de testare se referă la ceea ce este testat. Este necesară cunoașterea solubilității în apă (a se vedea capitolul A.6 din prezenta anexă) și a presiunii vaporilor substanței de testare (a se vedea capitolul A.4 din prezenta anexă). Trebuie să fie disponibilă o metodă analitică fiabilă de cuantificare a substanței din soluțiile de testat cu o precizie cunoscută și validată și cu o limită de cuantificare. Deși acestea nu sunt necesare pentru efectuarea testului, rezultatele unui test de toxicitate acută (a se vedea capitolele C.1 sau C.49 din prezenta anexă), de preferință efectuat cu speciile alese pentru testul de față, pot furniza informații utile.

5. În cazul în care metoda de testare este utilizată pentru testarea unui amestec, compoziția acestuia trebuie să fie caracterizată pe cât posibil, de exemplu de identitatea chimică a constituenților săi, prezența lor cantitativă și proprietățile specifice substanței (precum cele menționate mai sus). Înainte de a folosi această metodă de testare în scopul reglementării unui amestec, trebuie să se ia în considerare dacă aceasta va avea rezultate acceptabile în acest scop.
6. Informațiile utile includ formula structurală, gradul de puritate al substanței, solubilitatea în apă, stabilitatea în apă și la lumină, pK_a , P_{ow} și rezultatele unui test de biodegradabilitate rapidă (de exemplu, capitolele C.4 sau C.29 din prezenta anexă).

VALIDITATEA TESTULUI

7. Pentru ca un test să fie valid, trebuie să se aplice următoarele condiții:
 - concentrația oxigenului dizolvat trebuie să fie pe parcursul întregii perioade de expunere mai mare de 60 % din valoarea de saturație din aer;
 - temperatura apei nu trebuie să difere cu mai mult de $\pm 1,5$ °C între camerele de testare sau în zile succesive în niciun moment pe parcursul testului și trebuie să fie menținută în intervalele de temperatură specificate pentru specia de testare (apendicele 2);
 - măsurarea analitică a concentrațiilor de testare este obligatorie;
 - rata generală de supraviețuire a ouălor fertilizate și de reușită după eclozare la probele de control și, atunci când este cazul, la probele de control cu solvenți trebuie să fie mai mare sau egală cu limitele definite în appendicele 2.
8. Dacă se observă o abatere minoră de la criteriul de validitate, consecințele trebuie luate în considerare în relație cu fiabilitatea datelor testului, iar aceste considerații trebuie incluse în raport. Efectele asupra supraviețuirii, eclozării sau creșterii care apar la controlul cu solvent, prin comparație cu controlul negativ, trebuie raportate și discutate în contextul fiabilității datelor testului.

DESCRIEREA METODEI

Camere de testare

9. Se poate utiliza orice tip de vas din sticlă, oțel inoxidabil sau alt material inert din punct de vedere chimic. Întrucât este cunoscut faptul că siliconul are o capacitate crescută de a absorbi substanțe liofile, trebuie minimizată utilizarea tuburilor de silicon în cadrul studiilor dinamice și a garniturilor de silicon în contact cu apa, prin folosirea, de exemplu, a acvariilor din sticlă de tip monobloc. Dimensiunile vaselor trebuie să fie suficient de mari pentru a permite creșterea corespunzătoare a controlului, menținerea concentrației oxigenului dizolvat (de exemplu, pentru speciile de pești mici este suficient un bazin cu un volum de 7 litri) și respectarea ratei de încărcare indicate la punctul 19. Se recomandă poziționarea aleatorie a camerelor de testare în zona de testare. Un protocol de dispunere aleatorie a blocurilor cu fiecare concentrație prezentă în fiecare bloc este de preferat unui protocol complet aleatoriu. Camerele de testare trebuie protejate împotriva oricărei perturbări nedorite. Sistemul de testare trebuie, de preferință, să fie condiționat cu concentrații ale substanței de testare pe o perioadă de timp suficientă pentru a demonstra stabilitatea concentrațiilor de expunere înainte de introducerea organismelor de testare.

Alegerea speciei

10. Tabelul 1 conține o listă cu specii de pește recomandate. Aceasta nu exclude folosirea altor specii, dar poate fi necesar ca procedura de testare să fie adaptată pentru a oferi condiții corespunzătoare de testare. În acest caz, argumentația care stă la baza alegerii speciei și a metodei de testare trebuie specificată în raport.

Îngrijirea peștilor reproducători

11. Detalii despre îngrijirea populației de pești reproducători în condiții satisfăcătoare se regăsesc în appendicele 3 și în referințele citate (3) (4) (5).

Manipularea ouălor fertilizate, a embrionilor și a larvelor

12. Inițial, ouăle fertilizate, embrionii și larvele pot fi expuse în interiorul vasului principal, în vase mai mici din sticlă sau oțel inoxidabil, prevăzute cu plase laterale sau la capete pentru a permite fluxul substanței chimice testate în cameră. Curgerea neturbulentă prin aceste camere de mici dimensiuni poate fi indusă prin suspendarea lor de un braț mobil, care le deplasează în sus și în jos, dar astfel încât să mențină organismele imersate. Ouăle fertilizate de salmonide pot fi puse pe stativ sau plase cu deschiderile suficient de mari pentru a permite larvelor să traverseze după eclozare.
13. În cazul în care au fost folosite recipiente, grile sau plase pentru a păstra ouăle în vasul principal de testare, acestea trebuie îndepărtate după eclozarea larvelor, conform orientărilor prezentate în apendicele 3, cu excepția plaselor care sunt păstrate pentru a împiedica larvele să scape. Dacă este necesar să se transfere larvele, acestea nu trebuie expuse la aer, iar plasele nu trebuie utilizate pentru a elibera larvele din recipientele pentru ouă. Momentul transferului variază în funcție de specie și trebuie să fie documentat în raport. Cu toate acestea, transferul nu este întotdeauna necesar.

Apa

14. Orice apă în care specia de testare prezintă o supraviețuire și o creștere pe termen lung corespunzătoare este adecvată ca apă de testare (a se vedea apendicele 4). Apa trebuie să fie de calitate constantă pe durata testului. Pentru ca apa de diluție să nu influențeze în mod nepermis rezultatele testelor (de exemplu, prin reacție cu substanța chimică de testare) sau să afecteze negativ comportamentul peștilor reproducători, trebuie prelevate periodic eșantioane pentru probă. Acolo unde se cunoaște calitatea relativ constantă a apei de diluție, trebuie să se măsoare, de exemplu bianual, conținutul în metale grele (de exemplu, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd și Ni), anioni și cationi principali (de exemplu, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), amoniu, pesticide cu clor rezidual total, carbon organic total și solide în suspensie. Dacă se știe că apa are o calitate variabilă, măsurătorile trebuie efectuate mai des; frecvența depinde de cât de variabilă este calitatea acesteia. Anumite caracteristici chimice ale unei ape de diluție acceptabile sunt prezentate în apendicele 4.

Soluții de testare

15. Pentru testele în regim de flux continuu, este necesar un sistem care să dozeze și să dilueze continuu soluția stoc a substanței de testare (de exemplu, pompă dozatoare, diluator proporțional, sistem saturator) pentru a furniza o serie de concentrații în camerele de testare. Debitul soluțiilor stoc și ale apei de diluție trebuie verificate periodic pe durata testului și nu trebuie să varieze cu mai mult de 10 % pe durata întregului test. Un debit echivalent cu cel puțin de cinci ori volumul unei camere în 24 de ore este considerat adecvat (3). Cu toate acestea, dacă se respectă rata de încărcare specificată la punctul 19, un debit mai mic, de exemplu de 2-3 volume de cameră, poate preveni îndepărtarea rapidă a hranei.
16. Soluțiile de testare ale concentrațiilor alese se prepară prin diluarea unei soluții stoc. Soluția stoc se prepară de preferință prin simpla amestecare sau agitare a substanței de testare în apa de diluție, folosind mijloace mecanice (de exemplu, cu un agitator sau cu ajutorul ultrasunetelor). Pentru obținerea unei soluții stoc cu o concentrație corespunzătoare se pot folosi coloane de saturare (coloane de solubilitate) sau metode de dozare pasivă (6). Nu se recomandă utilizarea unui solvent purtător. Cu toate acestea, în cazul în care este necesară utilizarea unui solvent, trebuie testat în paralel un vas de control cu solvent la aceeași concentrație precum cea a substanțelor chimice utilizate în tratamente; astfel, nivelul solventului ar trebui să fie de preferință egal în toate concentrațiile, precum și în vasul de control cu solvent. Pentru unele sisteme de diluție dificile din punct de vedere tehnic, concentrația solventului în vasul de control cu solvent trebuie să fie egală cu concentrația cea mai mare de solvent din grupul supus tratamentului. În cazul substanțelor chimice care sunt dificil de testat, trebuie consultat documentul de orientare al OCDE privind testarea toxicității acvatice a substanțelor și amestecurilor dificile (2). În cazul în care se utilizează un anumit solvent, alegerea solventului va fi determinată de proprietățile chimice ale substanței. Documentul de orientare al OCDE nr. 23 recomandă să nu se depășească o concentrație maximă de 100 μl/l. Pentru a evita eventuale efecte ale solventului asupra parametrilor măsurați (7), se recomandă menținerea concentrației solventului cât mai scăzută posibil.
17. Pentru efectuarea unui test în regim semistatic, pot fi urmate două proceduri diferite de reînnoire. Fie se prepară soluții noi de testare în recipiente curate, iar ouăle și larvele supraviețuitoare sunt transferate cu grijă în noile vase, fie organismele testate sunt păstrate în vasele de testare, în timp ce o porție (cel puțin două treimi) din volumul soluției de testare / de control este schimbată.

MOD DE OPERARE

Condiții de expunere*Durată*

18. Testul trebuie să înceapă imediat ce ouăle au fost fertilizate și de preferință imersate în soluțiile de testare înainte de începerea fazei de divizare a discului embrionar sau cât se poate de repede după încheierea acestei etape. Durata de testare depinde de specia folosită. Câteva durate recomandate sunt prezentate în apendicele 2.

Încărcarea

19. Numărul de ouă fertilizate la începutul testului trebuie să fie suficient pentru a îndeplini condițiile statistice. Acestea trebuie distribuite în mod aleatoriu în vasele supuse tratamentului și se vor folosi cel puțin 80 de ouă, împărțite în mod egal între puțin patru camere de testare duplicate pentru fiecare concentrație. Rata de încărcare (biomasă per volum de soluție testată) trebuie să fie suficient de scăzută astfel încât o concentrație a oxigenului dizolvat de minimum 60 % din valoarea de saturație din aer să poată fi menținută fără aerare pentru stadiile de ou și larvă. Pentru testele în regim de flux continuu, se recomandă o rată de încărcare care să nu depășească 0,5 g/l greutate umedă pe parcursul a 24 de ore și 5 g/l de soluție în orice moment (3).

20.

Lumina și temperatura

Perioada de expunere la lumină și temperatura apei trebuie să fie adecvate pentru specia testată (a se vedea apendicele 2).

Hrănirea

21. Hrana și hrănirea sunt critice și este esențială administrarea unei hrane corecte pentru fiecare etapă la intervale adecvate de timp și la un nivel suficient pentru a susține creșterea normală. Porțiile de hrană trebuie să fie aproximativ egale pentru toate probele duplicate, cu excepția cazului în care au fost adaptate pentru a justifica mortalitatea. Excedentul de hrană și fecale trebuie înlăturat dacă este cazul, pentru a evita acumularea de deșeuri. Regimuri detaliate de hrană sunt prezentate în apendicele 3, însă, pe măsură ce se acumulează experiență, hrana și regimul de hrănire sunt perfecționate permanent pentru a îmbunătăți rata de supraviețuire și pentru a optimiza creșterea. Hrana vie oferă o sursă de îmbogățire a mediului de viață și, prin urmare, trebuie să fie utilizată în loc de sau în plus față de alimentele congelate sau uscate ori de câte ori acest lucru este necesar în funcție de specie și de stadiul de viață.

Concentrațiile de testare

22. În mod normal, sunt necesare cinci concentrații ale substanței de testare, cu un minimum de patru probe duplicate pentru fiecare concentrație, diferențiate printr-un factor constant care nu depășește 3,2. Atunci când se alege intervalul concentrațiilor de testare, dacă sunt disponibile, se vor lua în considerare informații privind testarea toxicității acute, preferabil cu aceeași specie și/sau test de stabilire a intervalului. Cu toate acestea, trebuie avute în vedere toate sursele de informare atunci când se stabilește intervalul concentrațiilor de testare, inclusiv surse precum, prin extrapolare, datele testului de toxicitate acută pe embrioni de pește. Un test la valori-limită sau un test la valori-limită extins, cu mai puțin de cinci concentrații poate fi acceptabil ca test definitiv atunci când trebuie stabilite numai valorile empirice ale NOEC. În cazul în care se utilizează mai puțin de cinci concentrații, se va oferi o justificare pentru această alegere. Nu este necesară testarea concentrațiilor substanțelor chimice mai mari de LC₅₀ la 96 de ore sau 10 mg/l, oricare este mai scăzută dintre acestea.

Controale

23. Pe lângă seria de concentrații ale substanței de testare, se va testa o probă de control cu apă de diluție și, dacă este necesar, o probă de control cu solvent care conține solventul purtător (a se vedea punctul 16).

Frecvența determinărilor și a măsurărilor analitice

24. Înainte de începerea perioadei de expunere, se va asigura funcționarea corectă a sistemului de alimentare cu substanța chimică pentru toate probele duplicat (de exemplu, prin măsurarea concentrațiilor de testare). Metodele analitice necesare trebuie să fie stabilite, inclusiv limita adecvată de cuantificare (LOQ) și cunoștințe suficiente privind stabilitatea substanței în sistemul de testare. Pe durata testului, concentrațiile substanței de testare sunt determinate la intervale regulate în vederea caracterizării expunerii. Sunt necesare cel puțin cinci determinări. În cadrul sistemelor în regim dinamic, se vor face măsurători analitice ale substanței de testare într-o probă duplicat pentru fiecare concentrație cel puțin o dată pe săptămână schimbând probele duplicat în mod sistematic. Determinări analitice suplimentare vor îmbunătăți calitatea rezultatului testului. Se poate dovedi necesară filtrarea probelor pentru a îndepărta particulele în suspensie (de exemplu, cu ajutorul unui filtru cu pori de 0,45 μm) sau centrifugarea astfel încât determinările să fie realizate pe substanță în soluție reală. Pentru a reduce absorbția substanței de testare, este necesară saturarea filtrelor înainte de utilizare. Atunci când concentrațiile măsurate depășesc intervalul de 80-120 % din concentrația nominală, concentrațiile de efect trebuie determinate și exprimate în raport cu media aritmetică a concentrației pentru testele în flux continuu (a se vedea apendicele 6 din metoda de testare C.20 pentru calculul mediei aritmetice (8)) și exprimată în raport cu media geometrică a concentrațiilor măsurate pentru testele semistatice (a se vedea capitolul 5 din documentul de orientare al OCDE privind testarea toxicității acvatică a substanțelor și amestecurilor dificile (2)).
25. În timpul testului, oxigenul dizolvat, pH-ul și temperatura trebuie măsurate în toate vasele de testare cel puțin o dată pe săptămână, iar salinitatea și duritatea, în cazul în care acest lucru se justifică, la începutul și la sfârșitul testului. Este preferabil ca temperatura să fie monitorizată continuu în cel puțin un vas de testare.

Observații

26. **Stadiul dezvoltării embrionare:** stadiul embrionar la începutul expunerii la substanța de testare trebuie verificat cât mai exact posibil. Aceasta se poate realiza folosind un eșantion reprezentativ de ouă păstrate corespunzător și curățate.
27. **Eclozarea și supraviețuirea:** Observațiile referitoare la eclozare și supraviețuire trebuie să efectuate cel puțin o dată pe zi, iar numărul ouălor eclozate și al supraviețuitorilor trebuie înregistrat. Dacă se observă pe ouă prezența de funghi la debutul dezvoltării embrionare (de exemplu, în prima sau a doua zi a testului), ouăle respective trebuie numărate și îndepărtate. Exemplarele moarte de embrioni, larve și pești tineri trebuie îndepărtate imediat după ce au fost observate, întrucât se pot descompune rapid și pot fi dezintegrate prin acțiunile altor pești. La îndepărtarea exemplarelor moarte trebuie să se manifeste o grijă extremă pentru a nu lovi sau leza fizic ouăle/larvele din vecinătate. Simptomele care indică moartea variază în funcție de specie și de stadiul de viață. De exemplu:
- pentru ouăle fertilizate: în special în stadiile timpurii, o pierdere accentuată a translucidenței și schimbarea colorației, provocată de coagularea și/sau precipitarea proteinelor, conducând la un aspect alb-opac;
 - pentru embrioni, larve și exemplarele tinere de pești: imobilitatea și/sau absența mișcărilor respiratorii și/sau lipsa de reacție la stimuli mecanici.
28. **Aspectul anormal:** numărul de larve sau exemplare tinere de pești care prezintă anomalii legate de forma corpului trebuie înregistrat la intervale adecvate, în funcție de durata testului și de natura anomaliei în cauză. Trebuie remarcat faptul că exemplarele tinere și larvele anormale apar în mod natural, iar numărul lor poate reprezenta câteva procente în loturile de control ale unor specii. Atunci când anomaliile și comportamentul anormal asociat sunt considerate atât de severe încât produc o suferință majoră organismului și s-a ajuns la un punct dincolo de care nu se poate recupera, acesta poate fi scos din test. Animalele respective trebuie eutanasiate și considerate mortalități pentru analiza ulterioară a datelor. Dezvoltarea embrionară normală a fost documentată pentru cele mai multe specii recomandate în această metodă de testare (9) (10) (11) (12).
29. **Comportamentul anormal:** anomaliile, de exemplu hiperventilarea, înotul necoordonat, imobilitatea neobișnuită și un mod de hrănire atipic trebuie înregistrate la intervale adecvate, în funcție de durata testului (de exemplu o dată pe zi pentru speciile de apă caldă). Aceste efecte, deși greu de cuantificat, pot contribui, atunci când sunt ținute sub observație, la interpretarea datelor privind mortalitatea.

30. **Greutate:** la sfârșitul testului, toți peștii supraviețuitori sunt cântăriți cel puțin pe bază de duplicat (se raportează numărul animalelor din proba duplicat și media greutății pentru fiecare animal): este preferată greutatea umedă – (zvântați), dar se poate raporta, de asemenea, greutatea uscată (13).
31. **Lungime:** la sfârșitul testului, se măsoară lungimile individuale. Se recomandă lungimea totală, însă dacă se constată o putrefacție sau o rosătură la înotătoarea caudală, se folosește lungimea standard. Trebuie folosită aceeași metodă pentru toți peștii dintr-un test dat. Lungimea individuală poate fi măsurată folosind, de exemplu, șublere, o cameră foto digitală sau un micrometru ocular calibrat. Lungimile minime tipice sunt definite în apendicele 2.

DATE ȘI RAPORTARE

Tratamentul rezultatelor

32. Se recomandă ca proiectarea testului și alegerea testului statistic să permită o putere adecvată (cel puțin 80 %) de a detecta schimbări cu importanță biologică ale punctelor finale în cazul în care urmează să fie raportată o NOEC. Este posibil ca raportarea unor concentrații de efect și a unor parametri relevanți să depindă de un cadru de reglementare. În cazul în care trebuie raportată o EC_x , proiectarea testului și selectarea modelului de regresie trebuie să permită estimarea EC_x astfel încât (i) intervalul de încredere de 95 % raportat pentru EC_x să nu conțină zero și să nu fie excesiv de mare, (ii) intervalul de încredere de 95 % pentru media preconizată a EC_x să nu conțină media probelor de control, (iii) să nu există o neconcordanță semnificativă a modelului de regresie cu datele. Fiecare abordare impune identificarea schimbării procentuale la fiecare punct final care trebuie identificat sau estimat. Proiectarea testului trebuie adaptată pentru a permite acest lucru. Atunci când condițiile de mai sus necesare pentru determinarea EC_x nu sunt îndeplinite, se va folosi abordarea NOEC. Este posibil să nu se aplice aceeași schimbare procentuală pentru toate punctele finale și să nu poată fi conceput un test fezabil care să îndeplinească aceste criterii pentru toate punctele finale. Prin urmare, este important ca atenția să se concentreze asupra punctelor finale pentru testul respectiv în vederea unei proiectări adecvate a testului. Diagramele statistice de flux și indicațiile pentru fiecare abordare sunt prezentate în apendicele 5 și 6 pentru interpretarea datelor și alegerea celui mai potrivit test sau model statistic. Alte abordări statistice pot fi utilizate, cu condiția ca acestea să fie justificate din punct de vedere științific.
33. Este necesar ca variațiile să fie analizate în cadrul fiecărui set de probe duplicat folosind analiza de varianță sau procedurile tabelor de contingență, precum și metode adecvate de analiză statistică pe baza acestor analize. Pentru a realiza o comparație multiplă între rezultatele obținute la concentrații individuale și rezultatele obținute pentru loturile de control, se recomandă testul regresiv Jonckheere-Terpstra sau Williams pentru răspunsuri continue și un test regresiv Cochran-Armitage pentru răspunsuri cantitative în concordanță cu relația monotonă concentrație-răspuns și cu lipsa dovezii varianței extra-binomiale (14). Atunci când nu se înregistrează nicio varianță extra-binomială, se recomandă modificarea Rao-Scott a testului Cochran-Armitage (15) (16) sau testele Williams/Dunnett (după transformarea trigonometrică) sau un test Jonckheere-Terpstra aplicat proporțiilor probelor duplicat. Acolo unde datele nu corespund relației monotone concentrație-răspuns, se pot utiliza metodele Dunnett, Dunn sau Man-Whitney pentru un răspuns continuu și textul exact al lui Fisher pentru răspunsuri cantitative (14) (17) (18). Atunci când se aplică o metodă sau un model statistic, trebuie acordată atenție ca cerințele metodei sau ale modelului să fie îndeplinite (de exemplu, se estimează și se ia în calcul variabilitatea camerei la cameră în proiectarea testului și alegerea testului sau a modelului). Datele vor fi evaluate pentru normalitate, iar apendicele 5 indică modul în care trebuie procedat cu reziduurile provenite de la o analiză de varianță. Apendicele 6 prezintă considerații suplimentare pentru abordarea de regresie. Transformările pentru a îndeplini cerințele unui test statistic trebuie să fie luate în considerare. Cu toate acestea, transformările care permit ajustarea unui model de regresie necesită o atenție deosebită deoarece, de exemplu, o schimbare de 25 % în răspunsul netransformat nu corespunde unei schimbări de 25 % într-un răspuns transformat. În toate studiile, camera de testare și nu peștii individuali reprezintă unitatea de analiză și unitatea de testare, iar atât testele de regresie, cât și cele de ipoteză trebuie să reflecte aceste lucruri (3) (14) (19) (20).

Raportul de testare

34. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele date:

Substanța de testare:

Substanță mono-constituent

- aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;
- identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS, codul SMILES sau InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților ca fiind adecvată și practic realizabilă etc. (inclusiv conținutul de carbon organic, dacă este cazul)

Substanță multi-constituent, UVCB și amestecuri:

- caracterizate pe cât posibil, de exemplu, de identitatea chimică (a se vedea mai sus), prezența cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale constituenților

Speciile de testare:

- numele științific, subspecia, sursa și metoda de colectare a ouălor fertilizate și manipularea ulterioară.

Condiții de testare:

- metoda de testare folosită (de exemplu, semistatică sau în regim dinamic, încărcarea);
- Perioada (perioadele) de expunere la lumină;
- proiectarea testului (de exemplu, numărul de camere de testare și duplicate, numărul pe ouă per duplicat, materialul și mărimea camerei de testare (înălțime, lățime, volum), volumul apei pentru fiecare cameră de testare);
- metoda de preparare a soluțiilor stoc și frecvența reînnoirii (se specifică agentul de solubilizare și concentrația sa, atunci când este folosit);
- metoda de dozare a substanței de testare (de exemplu, pompe, sisteme de diluare);
- eficiența de recuperare a metodei și concentrațiile de testare nominale, limita de cuantificare, mediile valorile măsurate și abaterile lor standard în vase de testare și metoda prin care acestea au fost obținute, precum și dovezi că măsurătorile se referă la concentrațiile substanței de testare în soluție reală;
- caracteristicile apei de diluție: pH, duritate, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat, nivelul clorului rezidual (dacă s-a făcut măsurarea), carbonul organic total (dacă s-a făcut măsurarea), solide în suspensie (dacă s-a făcut măsurarea), salinitatea mediului de testare (dacă s-a făcut măsurarea) și alte măsurători făcute;
- calitatea apei în vase de testare, pH, duritate, temperatura și concentrația oxigenului dizolvat;
- informații precise legate de alimentație (de exemplu, tipul de aliment(e), sursă, cantitatea administrată și frecvența).

Rezultate raportate individual (sau per duplicat) ca medie și coeficient de variație, după caz, pentru următoarele puncte finale:

- date care demonstrează că probele de control au îndeplinit standardul de supraviețuire globală acceptabil pentru specia testată (apendicele 2);
- date privind mortalitatea în fiecare stadiu (embrion, larvă și exemplare tinere) și mortalitatea cumulată;
- zilele de eclozare și numărul larvelor eclozate în fiecare zi, precum și sfârșitul eclozării;
- numărul de pești sănătoși la încheierea testului;
- date privind lungimea (se indică fie lungimea standard sau totală) și greutatea animalelor supraviețuitoare;
- incidența, descrierea și numărul anomaliilor morfologice, dacă există;
- incidența, descrierea și numărul efectelor comportamentale, dacă există;

- abordarea analizei statistice (analiza de regresie sau analiza de varianță) și prelucrarea datelor (testul statistic sau modelul utilizat);
- concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC) pentru fiecare răspuns evaluat;
- concentrația cea mai mică la care este observat un efect (la $p=0,05$) pentru fiecare răspuns evaluat (LOEC);
- EC_x pentru fiecare răspuns evaluat, dacă este cazul, precum și intervalele de încredere (de exemplu 90 % sau 95 %) și un grafic al modelului ajustat utilizat pentru calcularea lor, panta curbei concentrație-răspuns, formula modelului de regresie, parametrii estimați și erorile standard.

Orice abatere de la metoda de testare.

Discutarea rezultatelor, inclusiv orice influență a abaterilor de la metoda de testare asupra rezultatelor testului.

Tabelul 1

Specii de pești recomandate pentru testare

Apă dulce	Specii marine și de estuar
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Păstrăvi curcubeu	<i>Cyprinodon variegatus</i> <i>Cyprinodon variegatus</i>
<i>Pimephales promelas</i> Pimephales promelas	<i>Menidia</i> sp. <i>Menidia</i> sp.
<i>Danio rerio</i> Pește-zebră	
<i>Oryzias latipes</i> <i>Oryzias latipes</i>	

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.171, OECD, Paris.
- (2) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23, OECD Paris.
- (3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early LifeStage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 124188. 26 pp.
- (4) Brauhn, J.L. and R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA660/375011, Duluth, Minnesota.
- (5) Brungs, W.A. and B.R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA600/377061, Duluth, Minnesota.
- (6) Adolfsson-Erici, *et al.* (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, Chemosphere 86, 593-599.
- (7) Hutchinson, T.H. *et al.* (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.
- (8) Capitolul C.20 din prezenta anexă, Test de reproducere pe *Daphnia magna*.

-
- (9) Hansen, D.J. and P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (*Cyprindon variegatus*) for lifecycle toxicity tests, In *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.
- (10) Kimmel, H. B. et al. (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203:253–310.
- (11) Gonzalez-Doncel, M. et al (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthyidae) *Journal of Applied Ichthyology*, 20:1–14.
- (12) Devlin, E.W. et al. (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C..
- (13) Oris, J.T., S.C. Belanger, and A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, *Environmental Toxicology and Chemistry* 31; 2, 370 – 376.
- (14) OECD (2006). *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.
- (15) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48, 577-585.
- (16) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, *Statistics in Medicine* 18, 1373-1385.
- (17) Dunnett C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of American Statistical Association*, 50, 1096-1121.
- (18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.
- (19) Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (1985), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publication Corporation, New York.
- (20) McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson (1980). *Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data*, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.
-

Apendicele 1

DEFINIȚII

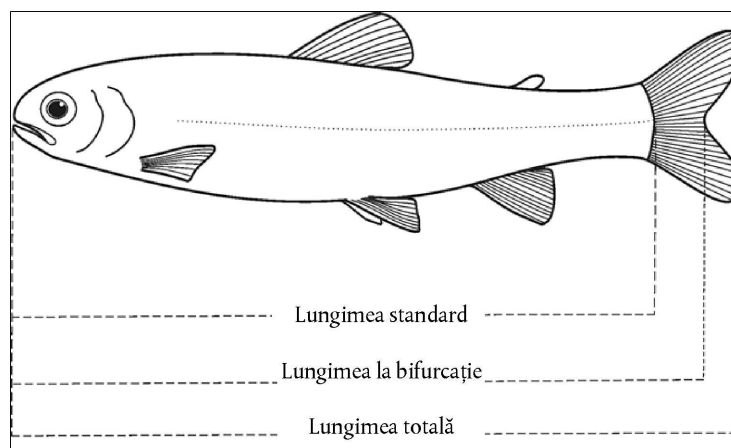
Lungimea cozii (LC): se referă la lungimea cuprinsă între vârful botului și capătul radiilor de mijloc ale înotătoarei caudale și este utilizată la peștii la care este dificil de precizat unde se termină coloana vertebrală (www.fishbase.org)

Lungimea standard (SL): se referă la lungimea unui pește măsurat de la vârful botului până la extremitatea posterioară a ultimei vertebre sau la extremitatea posterioară a liniei laterale a pedunculului. Cu alte cuvinte, această măsurătoare exclude lungimea înotătoarei caudale. (www.fishbase.org)

Lungimea totală (LT): se referă la lungimea cuprinsă între vârful botului și vârful lobului mai lung a înotătoarei caudale, măsurată de regulă cu lobii comprimați de-a lungul liniei laterale. Acesta este o măsurătoare în linie dreaptă, nu una măsurată urmând curbura corpului (www.fishbase.org)

Figura 1

Descrierea diferitelor lungimi folosite



Substanță chimică: O substanță sau un amestec

EC_x: (concentrație de efect pentru un efect x %) reprezintă concentrația care determină x % dintr-un efect asupra organismelor testate într-un timp de expunere stabilit în comparație cu un control. De exemplu, o EC₅₀ este concentrația estimată să producă un efect asupra unui parametru de testare în 50 % din populația expusă într-un timp de expunere stabilit.

Concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) este cea mai scăzută concentrație testată a substanței testate la care se constată un efect de reducere semnificativ din punct de vedere statistic asupra creșterii (la $p < 0,05$) în comparație cu proba de control, într-un anumit timp de expunere. Cu toate acestea, toate concentrațiile de testare mai mari decât LOEC trebuie să aibă un efect nociv egal cu sau mai mare decât cel observat la LOEC. Atunci când cele două condiții menționate nu pot fi îndeplinite, trebuie să se furnizeze o explicație completă privind modul în care a fost selectată LOEC (și, prin urmare, NOEC). Apendicele 5 și 6 oferă orientări în acest sens.

Concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC) este concentrația de testare situată imediat sub LOEC, care, în comparație cu proba de control, nu are un niciun efect de reducere semnificativ din punct de vedere statistic ($P < 0,05$), într-un timp de expunere stabilit.

Substanță de testare: orice substanță sau amestec testat cu ajutorul prezentei metode de testare.

UVCB: substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produse de reacție complexă sau materiale biologice.

IUPAC: Uniunea internațională de chimie pură și aplicată.

SMILES: Specificație pentru înregistrarea simplificată a structurii moleculare sub formă de text liniar.

CONDIȚIILE, DURATA TESTULUI ȘI CRITERIILE DE SUPRAVIEȚUIRE PENTRU SPECIILE RECOMANDATE

Specie	CONDIȚII DE TESTARE			DURATA DE TESTARE RECOMANDATĂ	Lungimea totală medie minimă a peștilor de control la sfârșitul studiului (mm) (1)	RATA DE SUPRAVIEȚUIRE A CONTROALELOR (minim)	
	Temperatura (°C)	Salinitatea (‰)	Perioada de expunere la lumină (ore)			Rata de succes a eclozării	Rata de succes după eclozare

Specii de apă dulce:

<i>Oncorhynchus mykiss</i> Păstrăvi curcubeu	10 ± 1,5 (2)		12 – 16 (3)	2 săptămâni după ce controalele se hrănesc la liber (sau 60 de zile după eclozare)	40	75 %	75 %
<i>Pimephales promelas</i> Pimephales promelas	25 ± 1,5		16	32 de zile de la începutul testului (sau 28 de zile după eclozare)	18	70 %	75 %
<i>Danio rerio</i> Pește-zebră	26 ± 1,5		12 – 16 (4)	30 de zile după eclozare	11	70 %	75 %
<i>Oryzias latipes</i> Oryzias latipes	25 ± 2		12 – 16 (4)	30 de zile post eclozare	17	80 %	80 %

Specii marine sau din estuar:

<i>Cyprinodon variegatus</i> Cyprinodon variegatus	25 ± 1,5	15-35 (5)	12 – 16 (4)	32 de zile de la începutul testului (sau 28 de zile după eclozare)	17	75 %	80 %
<i>Menidia sp.</i> Menidia sp.	22 – 25	15-35 (5)	13	28 zile	20	80 %	60 %

Legendă:

- (1) Lungimea totală medie minimă tipică nu este un criteriu de validitate, însă abaterile situate sub cifra de mai jos ar trebui examinate cu atenție în raport cu sensibilitatea testului. Lungimea totală medie minimă este derivată dintr-o selecție de date disponibile în prezent.
- (2) Varietatea testată de păstrăv-curcubeu poate necesita utilizarea altor temperaturi. Populația de pești reproducători trebuie ținută la aceeași temperatură precum cea folosită pentru ouă. După primirea ouălor de la un crescător, este necesară o perioadă scurtă (de exemplu, 1-2 h) de adaptare la temperatura de testare.
- (3) Întuneric pentru larve până la o săptămână după eclozare, cu excepția cazului în care se inspectează, apoi o lumină atenuată pe tot parcursul testului (12-16 ore de expunere la lumină) (4).
- (4) Pentru orice condiții de testare indicate, regimul de lumină trebuie să fie constant.
- (5) Pentru orice test indicat, se efectuează cu o precizie de ± 2‰.

HRĂNIREA ȘI MANIPULAREA ANIMALELOR REPRODUCĂTOARE ȘI DE TESTARE PENTRU SPECIILE RECOMANDATE

SPECIE	ALIMENTE (*)				ORA DE TRANSFER DE LA ECLOZARE	TIMPUL PÂNĂ LA PRIMA HRĂNIRE
	Pești reproducători	Larve proaspăt eclozate	Exemplare tinere			
			Tip	Frecvență		
Specii de apă dulce:						
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Păstrăvi-curcubeu	Hrană pentru păstrăvi	Niciuna ^(a)	hrană de cultură de pornire pentru păstrăvi BSN	2-4 porții de hrană pe zi	14-16 zile de la eclozare sau când încep să urce la suprafață (nu este esențial)	19 de zile de la eclozare sau când încep să urce la suprafață
<i>Pimephales promelas</i> Pimephales promelas	BSN, hrană sub formă de fulgi, FBS	BSN	BSN, hrană sub formă de fulgi	2-3 ori pe zi	după eclozare este de 90 %	după 2 zile de la eclozare
<i>Danio rerio</i> Peștele-zebră	BSN, hrană sub formă de fulgi	hrană comercială pentru larve, protozoare ^(b) , proteine ^(c)	BSN48, mâncare sub formă de fulgi,	BSN o dată zilnic; hrană sub formă de fulgi de două ori zilnic	după eclozare este de 90 %	2 zile după eclozare
<i>Oryzias latipes</i> Oryzias latipes	hrană sub formă de fulgi	BSN, hrană sub formă de fulgi (sau protozoare sau rotifere)	BSN48, hrană sub formă de fulgi (sau rotifere)	BSN o dată zilnic; hrană sub formă de fulgi de două ori zilnic sau hrană sub formă de fulgi sau rotifere o dată zilnic	nu se aplică	6-7 zile după eliberarea gameților
Specii marine și de estuar						
<i>Cyprinodon variegatus</i> Cyprinodon variegatus	BSN, hrană sub formă de fulgi, FBS	BSN	BSN 48	2-3 porții de hrană pe zi	nu se aplică	1 zi de la eclozare/când încep să urce la suprafață
<i>Menidia sp.</i> Menidia sp.	BSN48, hrană sub formă de fulgi	BSN	BSN48	2-3 porții de hrană pe zi	nu se aplică	1 zi după eclozare/când încep să urce spre suprafață

Legendă:

(*) Hrana va fi îndestulătoare. Excedentul de hrană și fecale va fi îndepărtat după cum este necesar pentru a evita acumularea de deșeuri.

FBS creveți Artemia congelați; adulți de *Artemia* sp

BSN nauplii de Artemia; proaspăt eclozați

BSN48 nauplii de Artemia; vechi de 48h

^(a) larvele în vitellus nu necesită hrană^(b) filtrate din cultură mixtă^(c) granule din procesul de fermentație

Apendicele 4

ANUMITE CARACTERISTICI CHIMICE ALE APEI DE DILUȚIE ACCEPTABILE

Componentă	Concentrație-limită
Particule în suspensie	5 mg/l
Carbon organic total	2 mg/l
Amoniac neionizat	1 µg/l
Clor rezidual	10 µg/l
Totalul pesticidelor organofosforoase	50 ng/l
Totalul pesticidelor organoclorice și a bifenililor policlorurați	50 ng/l
Total clor organic	25 ng/l
Aluminiu	1 µg/l
Arsenic	1 µg/l
Crom	1 µg/l
Cobalt	1 µg/l
Cupru	1 µg/l
Fier	1 µg/l
Plumb	1 µg/l
Nichel	1 µg/l
Zinc	1 µg/l
Cadmiu	100 ng/l
Mercur	100 ng/l
Argint	100 ng/l

Apendicele 5

RECOMANDĂRI STATISTICE PRIVIND DETERMINAREA NOEC

Generalități

Unitatea de analiză este bazinul duplicat. Astfel, pentru măsurători continue, cum ar fi dimensiunea, se va calcula media sau mediana replicilor, iar aceste valori duplicate constituie datele pentru analiză. Puterea statistică a testelor utilizate trebuie demonstrată de preferință pe baza unei memorii de date adecvată pentru fiecare laborator. Efectul dimensional care poate fi detectat cu o putere de 75-80 % trebuie să fie indicat pentru fiecare punct final al testului care urmează a fi utilizat.

Bazele de date disponibile la data elaborării prezentei metode de testare stabilesc puterea posibilă în conformitate cu procedurile statistice recomandate. Un laborator individual trebuie să își demonstreze capacitatea de a îndeplini acest criteriu de putere fie prin efectuarea de analize statistice, fie demonstrând că valoarea coeficientului de variație (CV) pentru fiecare răspuns nu depășește a 90-a procentilă din CV utilizat în elaborarea orientării tehnice. Tabelul 1 prezintă valorile CV. În cazul în care sunt disponibile doar mediile probelor sau mediane, valoarea CV din cadrul aceluiași duplicat poate fi ignorată.

Tabelul 1

A 90-a procentilă din CV pentru anumite specii de apă dulce

Specie	Răspuns	CV între duplicate	CV în cadrul duplicatelor
Păstrăv-curcubeu	Lungime	17,4	9,8
	Greutate	10,1	28
Pimephales promelas	Lungime	16,9	13,5
	Greutate	11,7	38,7
Peștele-zebră	Lungime	43,7	11,7
	Greutate	11,9	32,8

Pentru aproape toate testele statistice utilizate pentru evaluarea studiilor toxicologice de laborator, comparațiile de bază sunt cele între grupurile supuse tratamentului și grupul de control. Din acest motiv, nu este oportun să se solicite un test F semnificativ ANOVA înainte de a utiliza testul Dunnett sau Williams sau un test semnificativ Kruskal-Wallis înainte de a utiliza testele Konckheere-Terpstra, Mann-Whitney sau Dunn (Hochberg and Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al.* 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Testul Dunnett are o ajustare de multiplicitate încorporată, iar ratele de rezultate fals pozitive și fals negative sunt afectate în mod nefavorabil prin utilizarea testului F. În mod similar, testele Williams și Jonckheere-Terpstra regresive care folosesc un nivel de semnificație de 0,05 la fiecare pas mențin o rată totală de rezultate fals pozitive de 5 %, iar această rată și puterea statistică a testelor sunt afectate negativ de folosirea testului F sau Kruskal-Wallis. Testele Mann-Whitney și Dunn trebuie ajustate pentru multiplicitate și se recomandă folosirea ajustării Bonferroni-Holm.

O discuție aprofundată a celor mai multe dintre recomandările privind testarea ipotezei și verificarea ipotezelor care stau la baza acestor teste este disponibilă în documentul OCDE (2006), care conține, de asemenea, o bibliografie vastă.

Tratarea probelor de control atunci când se utilizează un solvent

Dacă se utilizează un solvent, atunci trebuie incluse o probă de control cu apă de diluție și o probă de control cu solvent. Valorile celor două probe de control trebuie comparate pentru fiecare răspuns și combinate pentru analiza statistică în cazul în care nu se constată nicio diferență semnificativă între acestea. În caz contrar, proba de control cu solvent se va utiliza pentru determinarea NOEC sau estimarea EC_{50} , iar proba de control cu apă nu se utilizează. A se vedea restricțiile în cadrul criteriilor de validitate (punctul 7).

În ceea ce privește lungimea, greutatea, proporția de eclozare a ouălor sau de mortalitate a larvelor, numărul larvelor anormale și prima sau ultima zi de ecloziune sau când încep să urce la suprafață, se va efectua un test T sau Mann-Whitney pentru a compara proba de control cu apă de diluție și proba de control cu solvent la un nivel de semnificație de 0,05, ignorând toate grupurile supuse tratamentului. Rezultatele acestor teste trebuie raportate.

Efectuarea măsurătorilor dimensionale (lungime și greutate)

Valorile lungimii și greutății individuale ale peștilor pot fi distribuite normal sau lognormal. În ambele cazuri, valorile medii ale duplicatelor tind să fie distribuite în mod normal în temeiul teoremei centrale de limită și confirmate de datele a mai mult de 100 de studii ELS asupra a trei specii de pești de apă dulce. Alternativ, în cazul în care datele sau bazele de date anterioare sugerează o distribuție lognormală pentru valorile dimensionale individuale ale peștilor, se va calcula logaritmul mediei duplicat al valorilor peștilor individuali, iar datele pentru analiză pot fi antilogaritmi ale acestor logaritme medii duplicat.

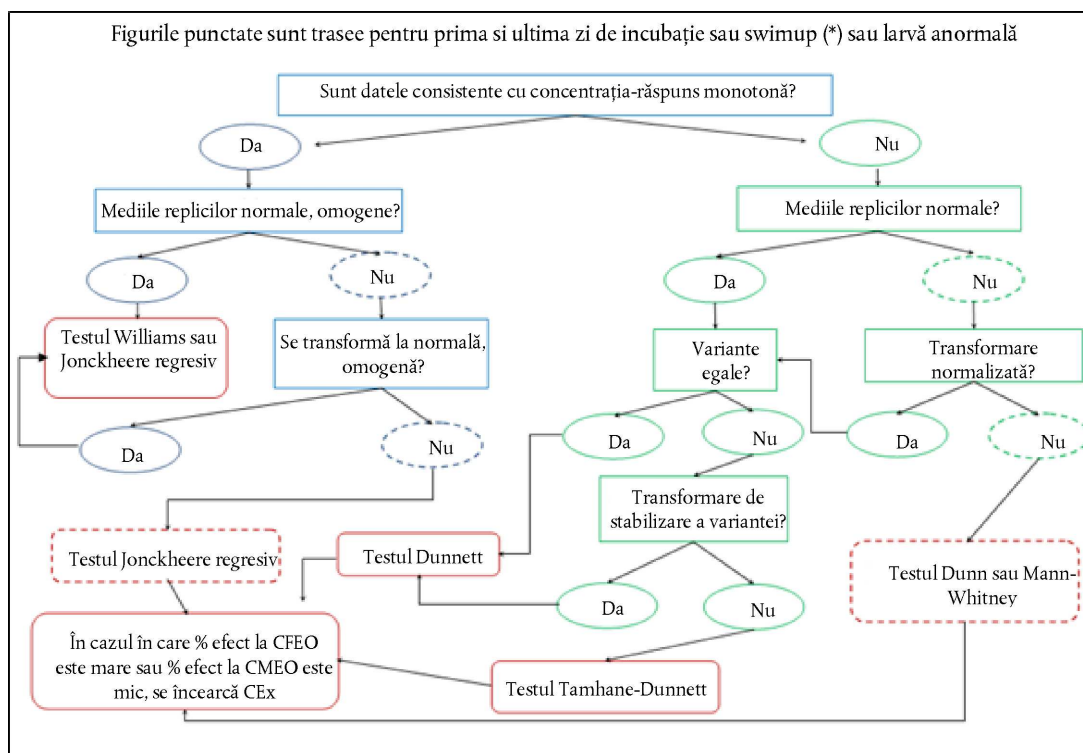
Datele trebuie evaluate din punct de vedere al consecvenței cu o distribuție normală și omogenitate a varianței. În acest scop, trebuie utilizate reziduurile provenite de la un model ANOVA cu concentrație ca unică variabilă de clasă explicativă. Pot fi folosite determinări vizuale de la diagrame de dispersie sau histograme sau diagrame de tip „stem and leaf” (tulpină și frunze). În mod alternativ, se poate utiliza un test formal cum ar fi Shapiro-Wilk sau Anderson-Darling. Consistența cu omogenitatea varianței poate fi evaluată prin examinarea vizuală a aceluiași diagrame de dispersie sau în mod formal din testul Levene. Doar testele parametrice (de exemplu, Williams, Dunnett) trebuie evaluate cu privire la normalitate sau omogenitatea varianței.

Trebuie să se acorde atenție posibilelor valori aberante și efectului lor asupra analizei. Se poate folosi testul lui Turkey pentru detectarea valorilor aberante și examinarea vizuală a aceluiași diagrame reziduale descrise mai sus. Trebuie reamintit faptul că observațiile sunt în întregime duplicate, astfel încât omiterea unei valori aberante din cadrul analizei trebuie efectuată numai după o examinare atentă.

Testele statistice care utilizează caracteristicile proiectării testului și probabilitatea biologică sunt testele regresive precum Williams și Jonckheere-Terpstra. Aceste teste presupun o relație concentrație-răspuns monotonă, iar datele trebuie evaluate din punct de vedere al coerenței cu această ipoteză. Acest lucru poate fi efectuat vizual cu ajutorul unei diagrame de dispersie a mediilor duplicat în opoziție cu concentrația testată. Ar fi util să se suprapună această diagramă de dispersie cu o diagramă liniară pe segmente legând mediile concentrațiilor ponderate de dimensiunea probei duplicat. O abatere majoră a diagramei liniare pe segmente de la monotonicitate ar indica o posibilă necesitate de a utiliza teste de non-tendență. Alternativ, se pot utiliza teste formale. Un test formal simplu este de a calcula contrastele lineare și pătratice ale mediilor concentrațiilor. În cazul în care contrastul pătratic este semnificativ, iar cel linear nu este, acest lucru poate fi o indicație a unei eventuale probleme legate de monotonicitate care trebuie evaluată ulterior pe baza diagramelor. Acolo unde normalitatea sau omogeneitatea varianței pot constitui o problemă, aceste contraste pot fi construite pe baza datelor transformate. Pot fi folosite proceduri alternative, cum ar fi testul Bartholomew pentru monotonicitate, însă acestea adaugă complexitate.

Figura 2

Diagrama NOEC cu măsurători dimensionale (lungime și greutate)



Cu excepția cazului în care datele nu sunt consecvente cu cerințele pentru aceste teste, NOEC se determină printr-o aplicare regresivă a testului Williams sau Jonckheere-Terpstra. OCDE (2006) oferă detalii cu privire la aceste proceduri. Pentru datele care nu sunt conforme cu cerințele testului de stabilire a tendinței, poate fi folosit testul Dunnitt sau testul TamhaneDunnitt (T3), ambele având încorporate ajustări pentru multiplicitate. Aceste teste presupun normalitate și, în cazul testului Dunnitt, omogeneitatea varianței. În cazul în care aceste condiții nu sunt îndeplinite, se poate folosi testul non-parametric Dunn. OCDE (2006) conține detalii privind toate aceste teste. Figura 2 oferă o imagine de ansamblu asupra modalităților de a alege un test.

Eclozarea ouălor și supraviețuirea larvelor

Datele sunt proporțiile de ouă care eclozează sau de larve care supraviețuiesc în probele duplicate individuale. Aceste proporții trebuie evaluate din punct de vedere al varianței extra-binomiale, care este comună dar nu universală pentru astfel de măsurători. Diagrama din figura 3 oferă orientări pentru alegerea testului; a se vedea textul pentru descrieri detaliate.

Două teste sunt utilizate în mod obișnuit. Acestea sunt testul Tarone C (a) (Tarone, 1979) și testul chi-pătrat, fiecare aplicat separat fiecărei concentrații de testare. În cazul în care se constată varianța extra-binomială chiar și într-o singură concentrație de testare, trebuie utilizate metode potrivite.

Formula 1

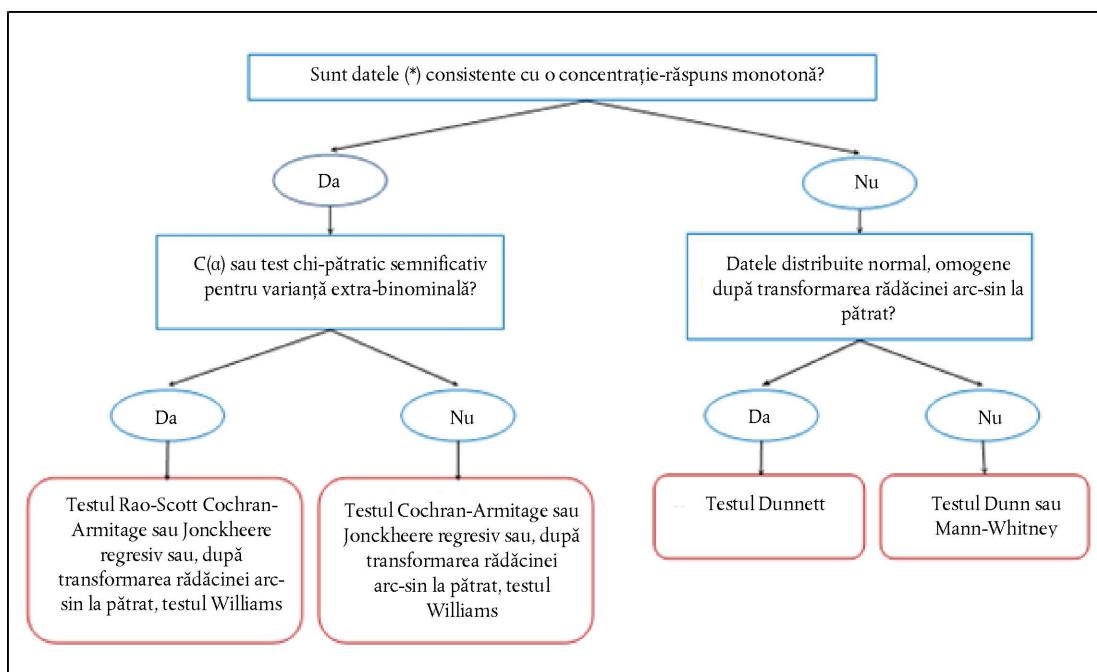
Testul Tarone C (a) (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^m \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1 - \hat{p})} - \sum_{j=1}^m n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^m n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

acolo unde $\hat{p}$ este proporția medie pentru o concentrație dată, m este numărul de bazine duplicat, n_j este numărul subiecților din proba duplicat și x_j este numărul subiecților din proba duplicat care răspund, de exemplu care nu au eclozat sau care au murit. Acest test se aplică separat fiecărei concentrații. Acest test poate fi văzut ca un test chi-pătrat ajustat, însă simulările de putere limitată efectuate de Tarone au demonstrat că acesta este mai puternic decât un test chi-pătrat.

Figura 3

Diagrama NOEC privind eclozarea ouălor și mortalitatea larvelor



(*) Datele sunt proporționale cu fiecare duplicat.

În cazul în care nu există dovezi semnificative de varianță extra-binomială, poate fi utilizat testul Cochran-Armitage regresiv. Acest test ignoră probele duplicat, așadar în cazurile în care există astfel de dovezi, se recomandă ajustarea Rao-Scott adusă testului Cochran-Armitage (RSCA) care ia în considerare probele duplicat, mărimile acestora și varianța extrabinomială. Testele alternative includ testul Williams și Jonckheere-Terpstra regresiv, precum și testul Dunnett astfel cum a fost descris în vederea efectuării măsurătorilor dimensionale. Aceste teste se aplică indiferent dacă se înregistrează sau nu o varianță extrabinomială, însă au o putere oarecum mai scăzută (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao and Scott 1992, 1999, Fung *et al.* 1994, 1996).

Prima sau ultima zi de ecloziune sau de urcare la suprafață

Răspunsul este un număr întreg indicând data de testare la care observația respectivă este efectuată pentru un bazin duplicat dat. Intervalul de valori este în general foarte limitat și există adesea proporții ridicate de valori apropiate, de exemplu, aceeași primă zi de eclozare se observă în toate probele duplicat și, eventual, în una sau două concentrații de testare scăzute. Testele parametrice precum Williams și Dunnett nu sunt adecvate pentru astfel de date. Cu excepția cazului în care există dovezi privind o lipsă semnificativă de monotonicitate, testul Jonckheere-Terpstra regresiv este foarte puternic pentru detectarea efectelor substanței chimice testate. În caz contrar, se poate utiliza testul Dunn.

Anomaliile larvelor

Răspunsul este numărul de larve care s-au dovedit anormale într-un mod sau altul. Acest răspuns are adesea o incidență scăzută și prezintă uneori aceleași probleme precum prima zi de ecloziune, dar înregistrează uneori nereguli privind relația concentrație-răspuns. În cazul în care datele urmează aproximativ forma unei concentrații de tip monoton, testul Jonckheere-Terpstra regresiv este puternic pentru detectarea efectelor. În caz contrar, se poate utiliza testul Dunn.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

Agresti, A. (2002); *Categorical Data Analysis*, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, *J. American Statistical Association* 50, 1096-1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, *Technometrics* 6, 241-252. Mai multe sume, comparații cu rang *technometrics* 6, 241-252.

Dunnett C. W. (1964); New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics* 20, 482-491.

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, *Risk Analysis* 14, 639-648.

Fung, K.Y, D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, *Canadian Journal of Statistics* 24, 431-454.

Hochberg, Y. and A. C. Tamhane (1987); *Multiple Comparison Procedures*, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); *Multiple Comparisons: Theory and Methods*; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, *Biometrika* 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, London.

OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, No. 54. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris..

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992) – A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48, 577-585.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1999) – A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, *Statistics in Medicine* 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. and Dykstra R.L. Robertson, T., Wright F.T., și dykstra R.L. (1988); (1988); *Order restricted statistical inference*, Wiley..

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, *Biometrika* 66, 585-590.

Williams D.A. (1971); A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics* 27, 103-117.

Williams D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics* 28, 519-531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratology, *Biometrics* 31, 949-952.

Williams D. A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, *Biometrika* 64, 9-14.

Apendicele 6

RECOMANDĂRI STATISTICE PENTRU ESTIMĂRILE REGRESIEI

Generalități

Observațiile utilizate pentru ajustarea unui model reprezintă mediile duplicat (lungime și greutate) sau proporțiile duplicat (eclozarea ouălor și mortalitatea larvelor) (OCDE 2006).

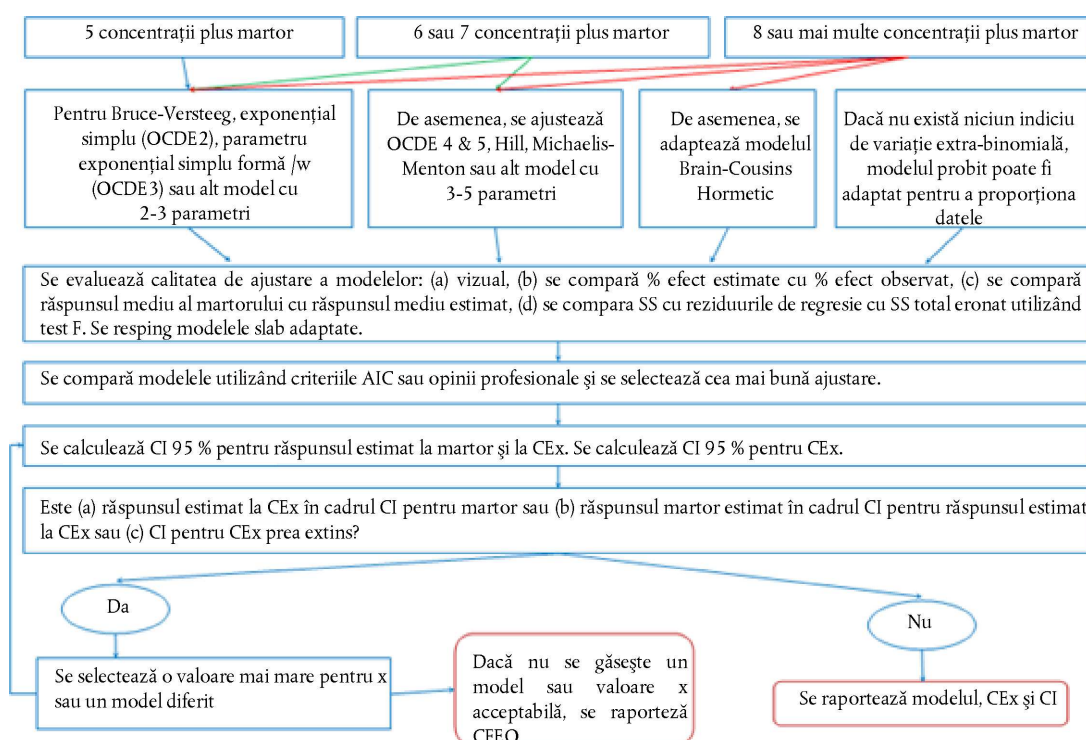
În general, se recomandă o analiză de regresie ponderată folosind ca pondere dimensiunea probei duplicat. Sunt posibile, de asemenea, alte scheme de ponderare, cum ar fi analiza ponderată folosind răspunsul mediu estimat sau o combinație a acestuia cu dimensiunea probei duplicat. Nu se recomandă ponderarea cu varianța reciprocă în cadrul aceleiași probe (Bunke *et al.* 1999, Seber and Wild, 2003, Motulsky and Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Orice transformare a răspunsurilor înainte de a fi supuse analizei trebuie să păstreze independența observațiilor și ECx și limitele de încredere trebuie exprimate în unitățile de măsură inițiale, mai degrabă decât în unități transformate. De exemplu, o schimbare de 20 % în logaritmul de lungime nu este echivalentă cu o schimbare de 20 % în lungime (Lyles *et al.* 2008, Draper and Smith 1999).

Diagrama din figura 4 oferă o prezentare generală a estimărilor ECx. Detaliile sunt descrise în textul de mai jos.

Figura 4

Diagrama de flux pentru estimarea ECx a lungimii și greutatei medii duplicat, sau a proporției eclozării ouălor sau mortalității larvelor, a se vedea textul pentru detalii suplimentare



Considerații privind eclozarea ouălor și mortalitatea larvelor

În ceea ce privește eclozarea ouălor și mortalitatea larvelor, în general este mai bine să se ajusteze un model descrescător, cu excepția cazului când se ajustează un model probit conform descrierii de mai jos. Cu alte cuvinte, trebuie să se modeleze proporția ouălor care nu eclozează sau a larvelor care nu supraviețuiesc. Motivul constă în faptul că EC_x se referă la o concentrație la care există o schimbare egală cu x % din răspunsul mediei probelor de control. În cazul în care 5 % din ouăle de control nu eclozează și se modelează numărul celor care nu reușesc să eclozeze, EC₂₀ se referă la o concentrație la care există o schimbare egală cu 20 % din procentul de 5 % din proba de control care a eșuat să eclozeze, ceea ce înseamnă o schimbare de $0,2 * 0,05 = 0,01$ sau 1 punct procentual la 6 % de eșec al ecloziunii. O astfel de modificare minoră nu poate fi estimată în mod semnificativ din datele disponibile și nu este importantă din punct de vedere biologic. Cu toate acestea, dacă se modelează proporția de ouă care eclozează, proporția probei de control va fi de 95 % în acest caz, iar o reducere de 20 % din media probei de control va însemna o schimbare de $0,95 * 0,2 = 0,18$, ajungându-se astfel de la o rată de succes a eclozării de 95 % la una de 77 % (= 95-18), iar concentrația de efect poate fi estimată și prezintă probabil un interes major. Aceasta nu reprezintă o problemă în cazul măsurătorilor dimensionale, deși în general efectele adverse asupra dimensiunii echivalează cu o scădere a dimensiunii.

Modele pentru dimensiune (lungime sau greutate) și rata de succes a ecloziunii sau rata de supraviețuire a larvelor

Cu excepția modelului hormetic Brain-Cousens, toate aceste modele sunt descrise și recomandate de OCDE (2006). Așa-numitele OCDE 2-5 sunt discutate, de asemenea, în Slob (2002) cu privire la testele de ecotoxicitate. Există, bineînțeles, multe alte modele care ar putea fi utile. Bunke, *et al.* (1999) enumeră mai multe modele care nu sunt incluse aici și conține nenumărate referințe la alte modele. Modelele enumerate mai jos sunt propuse ca fiind deosebit de adecvate în testele de ecotoxicitate și foarte frecvent folosite.

Cu 5 concentrații de testare plus control

- Bruce-Versteeg
- Exponențială simplă (OCDE 2)
- Exponențială cu parametru de formă (OCDE 3)
- Exponențială simplă cu limită inferioară (OCDE 4)

Cu 6 sau mai multe concentrații de testare plus control

- Exponențială cu parametru de formă și limită inferioară (OCDE 5)
- Michaelis-Menten
- Hill

În cazul în care există probe vizuale de hormeză (puțin probabil în cazul eclozării reușite sau al larvelor supraviețuitoare, dar observate uneori în observațiile dimensionale)

- Brain-Cousens Hormetic; Brain and Cousens (1989)

Modele alternative pentru eșecul eclozării ouălor și mortalitatea larvelor

- Modele suplimentare pentru aceste răspunsuri pot fi ajustate utilizând modele probit (sau logistice), cu condiția să nu existe nicio dovadă de varianță extra-binomială, iar incidența controlului să fie menționată în corespondența modelului. Aceasta nu este metoda preferată, întrucât folosește ca unitate de analiză probele individuale și nu proba duplicat (Morgan 1992, O'Hara Hines and Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Concordanța unui model unic

- Se compară vizual scăderea procentuală observată și preconizată pentru fiecare concentrație de testare (Motulsky and Christopoulos 2004, Draper și Smith 1999).

- Se compară eroarea pătratică medie regresivă cu eroarea pătratică medie pură folosind un test F (Draper and Smith 1999).
- Se verifică dacă fiecare termen din model este semnificativ diferit de zero (și anume, se determină dacă toți termenii din model sunt importanți), (Motulsky și Christopoulos, 2004).
- Diagramele reziduurilor provenite de la concentrația de testare vs. concentrația de regresie, posibil la o scară logaritmică (conc.). Nu ar trebui să existe un tipar pentru această diagramă, punctele ar trebui să fie dispersate în mod aleatoriu de-a lungul unei linii orizontale la înălțime zero.
- Datele trebuie evaluate din punct de vedere al normalității și omogeneității varianței, astfel cum este indicat în apendicele 5.
- În plus, normalitatea reziduurilor cu privire la modelul de regresie se evaluează folosind metodele indicate în apendicele 5 pentru reziduurile provenite de la analiza de varianță.

Compararea modelelor

- Se utilizează criteriul informațional Akiake (AIC). Valori mai mici ale AIC indică o compatibilitate mai bună, iar dacă $AICc(B) - AICc(A) \geq 10$, modelul A este cu siguranță mai bun decât modelul B (Motulsky and Christopoulos (2004).
- Se compară vizual cele două modele evidențiind în ce proporție îndeplinesc criteriul modelului unic de mai sus.
- Se recomandă principiul parcimoniei, conform căruia se utilizează modelul cel mai simplu care corespunde datelor în mod rezonabil (Ratkowsky 1993, Lyles et.al 2008).

Calitatea estimării EC_x

Intervalul de încredere (CI) pentru EC_x trebuie să fie limitat. Este necesară o apreciere statistică pentru a determina limitele intervalului de încredere astfel încât EC_x să fie în continuare utilă. Simulările privind modele regresive adecvate pentru eclozarea ouălor și datele dimensionale arată că aproximativ 75 % din intervalele de încredere pentru EC_x ($x = 10, 20$ sau 30) nu calibrează mai mult de două concentrații de testare. Aceasta oferă un ghid general pentru ceea ce este acceptabil și un ghid practic pentru ceea ce este realizabil. Numeroși autori afirmă necesitatea de a raporta intervalele de încredere pentru toți parametrii modelului, iar intervalele mari de încredere pentru parametrii modelului indică modele inacceptabile (Ott and Longnecker 2008, Alvord and Rossio 1993, Motulsky and Christopoulos 2004, Lyles *et al.* 2008, Seber and Wild 2003, Bunke *et al.* 1999, Environment Canada 2005).

Intervalul de încredere pentru EC_x (sau oricare alt parametru al modelului) nu trebuie să conțină cifra zero (Motulsky and Christopoulos 2004). Aceasta este regresia echivalentă cu o diferență semnificativă minimă, citată adesea în abordările verificărilor de ipoteză (de exemplu Wang *et al.*, 2000). Aceasta corespunde, de asemenea, intervalului de încredere pentru ca răspunsurile medii la LOEC să nu conțină media probelor de control. Trebuie să ne întrebăm dacă estimările parametrilor sunt plauzibile din punct de vedere științific. De exemplu, dacă intervalul de încredere pentru y_0 este $\pm 20 \%$, nu este plauzibilă nicio estimare EC₁₀. În cazul în care modelul estimează un efect de 20 % la o concentrație C, iar efectul maxim observat la concentrația C și la concentrații mai mici este de 10 %, atunci EC₂₀ nu este plauzibilă (Motulsky și Christopoulos 2004, Wang *et al.* 2000, Environment Canada 2005).

EC_x nu trebuie să necesite o extrapolare în afara intervalului de concentrații pozitive (Draper și Smith 1999, OCDE 2006). De exemplu, o recomandare generală ar fi ca EC_x să nu se situeze cu mai mult de 25 % sub cea mai scăzută concentrație testată sau deasupra celei mai mari concentrații testate.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, *Journal of Immunological Methods* 157, 155-163.

Brain P. and Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed res.* 29: 93-96.

Bunke droge, B., O., și polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); *Modelling Binary Data*, second edition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); *Modelling Survival Data in Medical Research*, second edition, Chapman and Hall, London.

Draper, N.R. and Smith, H. (1999); *Applied Regression Analysis*, third edition. New York: John Wiley & Fil.

Environment Canada (2005); *Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests*, Report EPS 1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); *Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples*, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. poindexter Evans, M. Brown, A., și C.R. Cooper (2008); Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 2008 November; 29(6): 878-886.

Morgan, B.J.T (1992); *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, London

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993); *Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time*, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121

OECD (2006); *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application*. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*, sixth edition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, *Journal of Industrial Microbiology* 12, 195-199. Principii de regresie nelineară, *Journal of Industrial microbiologie* 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, *Nonlinear Regression*, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints *Toxicol. Sci.*, 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 19, pp. 113–117, 2000.

C.48 Test de reproducere de durată scurtă la pești

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea privind testarea (TG) nr. 229 a OCDE (2012). Necesitatea dezvoltării și a validării unui test pe pești capabil să detecteze anumite substanțe chimice active endocrin își are originea în preocupările referitoare la faptul că anumite niveluri de substanțe chimice din mediu pot cauza efecte adverse atât asupra oamenilor, cât și asupra faunei sălbatice din cauza interacțiunii respectivelor substanțe chimice cu sistemul endocrin. În 1998, OCDE a inițiat o activitate prioritară de revizuire a orientărilor existente și de elaborare a unor noi orientări pentru screeningul și testarea unor potențiali perturbatori endocrini. Un element al acestei activități a constat în elaborarea unei orientări de testare pentru screeningul substanțelor chimice active asupra sistemului endocrin al unor specii de pești. Testul de reproducere cu durată scurtă pe pești a făcut obiectul unui amplu program de validare constând în studii interlaboratoare cu substanțe chimice selectate pentru a demonstra relevanța și fiabilitatea testului de detectare a substanțelor chimice care afectează reproducerea la pește prin diferite mecanisme, inclusiv endocrine (1, 2, 3, 4, 5). Toate punctele finale ale Orientării de testare a OCDE au fost validate pentru *Pimephales promelas* și un subset de puncte finale a fost validat pentru *Oryzias latipes* (și anume, vitelogenina și caracteristicile sexuale secundare) și pentru peștele-zebră (și anume, vitelogenina). Activitatea de validare a fost revizuită inter pares de către un grup de experți desemnați de coordonatorii naționali ai programului OCDE privind testarea (6), în parte, și de un grup independent de experți solicitat de Agenția pentru protecția mediului din Statele Unite (29). Testul nu este conceput să identifice mecanisme specifice de perturbare hormonală deoarece animalele testate au axul hipotalamo-hipofizo-gonadal (HPG) intact, care poate reacționa la substanțele chimice care au efecte asupra axului HPG la diferite niveluri.
2. Această metodă de testare descrie un test de screening *in vivo* în cadrul căruia pești masculi maturi din punct de vedere sexual și pești femele ovulante sunt ținuti împreună și expuși la o substanță chimică pe parcursul unei durate limitate a ciclului lor de viață (21 de zile). La finalul perioadei de expunere de 21 de zile, doi markeri biologici finali sunt măsurați la masculi și la femele, ca indicatori ai activității endocrine a substanței chimice testate; acești markeri sunt vitelogenine și caracteristicile sexuale secundare. Vitelogenina se măsoară la *Pimephales promelas*, la *Oryzias latipes* și la peștele-zebră, în timp ce caracteristicile sexuale secundare se măsoară la *Pimephales promelas* și la *Oryzias latipes*. În plus, fecunditatea cantitativă este monitorizată zilnic, pe toată durata testului. De asemenea, gonadele sunt păstrate și pot fi evaluate din punct de vedere histopatologic pentru a măsura capacitatea de reproducere a animalelor testate și pentru a spori forța probatorie a altor puncte finale.
3. Acest test biologic servește drept test de screening *in vivo* asupra reproducerii, iar aplicarea sa trebuie considerată în contextul Cadrului conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini (30). În acest cadru conceptual, testul de reproducere pe termen scurt la pești este propus la nivelul 3 ca un test *in vivo* care furnizează date cu privire la mecanismul (mecanismele)/calea (căile) endocrin(e),

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITĂRI

4. Vitelogenina (VTG) este produsă în mod normal de ficatul femelelor vertebrate ovipare ca răspuns la circulația estrogenului endogen. Aceasta este un precursor al proteinelor din vitellus și, după ce este produsă în ficat, circulă prin sânge la ovar, unde este absorbită și modificată de ouăle în dezvoltare. Vitelogenina este aproape nedetectabilă în plasma peștilor imaturi, femele și masculi, deoarece aceștia nu au suficient estrogen circulant; cu toate acestea, ficatul are capacitatea de a sintetiza și a secreta vitelogenină ca răspuns la o stimulare estrogenică exogenă.
5. Măsurarea vitelogeninei contribuie la detectarea substanțelor chimice cu diferite moduri estrogenice de acțiune. Detectarea substanțelor chimice estrogenice este posibilă prin măsurarea inducției vitelogeninei la peștii masculi și a fost amplu documentată în literatura științifică de specialitate revizuită *inter-pares* [de exemplu (7)]. Inducția vitelogeninei a fost demonstrată, de asemenea, în urma expunerii la androgeni aromatizabili (8, 9). O reducere a nivelului de estrogen circulant la femele, de exemplu prin inhibarea aromatazei care transformă androgenul endogen în estrogenul natural 17 β -estradiol, determină o reducere a nivelului de VTG, care se utilizează pentru detectarea substanțelor chimice cu proprietăți de inhibare a aromatazei (10, 11). Relevanța biologică a răspunsului vitelogeninei ca urmare a inhibării estrogenice/a aromatazei este bine stabilită și a fost amplu documentată. Cu toate acestea, este posibil ca producția de VTG la femele să fie afectată, de asemenea, de toxicitatea generală și de modurile de acțiune toxice non-endocrine, de exemplu de hepatotoxicitate.

6. Mai multe metode de măsurare au fost dezvoltate cu succes și standardizate pentru utilizarea de rutină. Acestea includ metodele cu specificitate de specie utilizând testul de imunoabsorbție cu anticorpi marcați enzimatic (ELISA), în care se utilizează imunochimie pentru a cuantifica vitelogenina produsă în probe mici de sânge sau hepatice prelevate de la pești individuali (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Pentru măsurarea vitelogeninei, de la *Pimephales promelas* se prelevează probe de sânge, de la peștele-zebră se prelevează probe de sânge sau omogenat din cap/coadă, iar de la *Oryzias latipes* se prelevează probe hepatice. În cazul *Oryzias latipes*, există o bună corelație între vitelogenina măsurată în sânge și cea măsurată în ficat (19). În apendicele 6 sunt descrise procedurile recomandate pentru prelevările efectuate în scopul măsurării vitelogeninei. Seturile pentru măsurarea vitelogeninei sunt disponibile pe scară largă; acestea trebuie să fie bazate pe o metodă ELISA validată, cu specificitate de specie.
7. Caracteristicile sexuale secundare ale peștilor masculi din anumite specii sunt vizibile la exterior, cuantificabile și sensibile la nivelurile de androgeni endogeni circulanți; acesta este cazul pentru *Pimephales promelas* și pentru *Oryzias latipes* – însă nu și pentru peștele-zebră, care nu are caracteristici sexuale secundare cuantificabile. Femelele își păstrează capacitatea de a dezvolta caracteristici sexuale secundare masculine atunci când sunt expuse la substanțe chimice androgenice din apă. În literatura de specialitate există mai multe studii pentru a documenta acest tip de răspuns în cazul *Pimephales promelas* (20) și *Oryzias latipes* (21). O atenuare a caracteristicilor sexuale secundare ale masculilor ar trebui interpretată cu prudență din cauza puterii statistice mici și ar trebui să fie bazată pe opiniile experților și pe greutatea dovezilor. Există limitări în ceea ce privește utilizarea peștelui-zebră în acest test din cauza absenței caracteristicilor sexuale secundare cuantificabile sensibile la substanțe chimice cu efecte androgenice.
8. În cazul *Pimephales promelas*, principalul indicator al expunerii la androgeni exogeni este numărul de tuberculi nupțialii situați pe botul femelei. În cazul femelelor de *Oryzias latipes*, numărul de procese papilare constituie principalul indicator al expunerii exogene la substanțe chimice cu efecte androgenice. Procedurile recomandate pentru evaluarea caracteristicilor sexuale ale *Pimephales promelas* și, respectiv, ale *Oryzias latipes* sunt indicate în apendicele 5A și în apendicele 5B.
9. Testul de 21 de zile pe pești include evaluarea cantitativă a producției de ouă și conservarea gonadelor pentru o eventuală examinare histopatologică. Unele autorități de reglementare pot solicita acest punct final suplimentar pentru o evaluare mai completă a capacității de reproducere a animalelor testate sau în cazurile în care vitelogenina și caracteristicile sexuale secundare nu au răspuns la expunerea la substanțele chimice. Deși unele puncte finale pot reprezenta o metodă de diagnosticare foarte importantă (de exemplu, inducția VTG la masculi și formarea de tuberculi la femele), nu toate punctele finale (de exemplu, fertilitatea și histopatologia gonadei) ale acestui test sunt concepute pentru a identifica în mod clar mecanismele celulare specifice de acțiune. Mai degrabă, seria de puncte finale permite la nivel colectiv realizarea de interferențe în ceea ce privește posibilele perturbări endocrine și, prin urmare, oferă recomandări pentru teste suplimentare. Deși nu este specifică sistemului endocrin, fertilitatea, datorită sensibilității demonstrate la substanțele chimice active endocrin (5), trebuie inclusă ca un parametru important deoarece, atunci când aceasta împreună cu alte metode nu sunt afectate, există mai multe șanse ca un compus să nu fie activ endocrin. Cu toate acestea, în cazul în care fertilitatea este afectată, acest lucru va influența în mare măsură forța probatorie a interferențelor. Recomandări cu privire la interpretarea datelor de testare și acceptarea rezultatelor sunt prezentate în detaliu în această metodă de testare.
10. Definițiile utilizate în cadrul acestei metode de testare sunt prezentate în apendicele 1.

PRINCIPIUL TESTULUI

11. În cadrul testului, masculii și femelele aflați în stadiu de reproducere sunt expuși împreună în vase de testare. Stadiul de adult și cel reproducător permite o diferențiere clară a fiecărui sex și, în consecință, o analiză a fiecărui punct final în funcție de sex, și asigură sensibilitatea acestora la substanțe chimice exogene. La finalul testului, sexul este confirmat printr-o examinare macroscopică a gonadelor după incizia ventrală a abdomenului cu ajutorul unei foarfeci. O prezentare generală a condițiilor relevante de biotestare este redată

în appendicele 2. Testul se efectuează în mod normal pe pești selectați dintr-o populație capabilă să elibereze gameți; nu trebuie utilizate animale senescente. Orientări privind vârsta peștilor și stadiul de reproducere al acestora sunt oferite în secțiunea privind selectarea speciei de pești. Testul este realizat utilizând trei concentrații de expunere la substanțe chimice, precum și un vas de control cu apă și un vas de control cusolvent, dacă este necesar. Pentru fiecare tratament se utilizează două vase sau vase duplicate (fiecare vas conținând 5 masculi și 5 femele) în cazul peștelui-zebră. În cazul *Pimephales promelas*, se utilizează patru vase sau vase duplicate pentru fiecare tratament (fiecare vas conținând 2 masculi și 4 femele). Acest principiu permite acomodarea comportamentului teritorial al masculului de *Pimephales promelas*, menținând în aceleași timp o putere suficientă a testului. În cazul *Oryzias latipes*, se utilizează patru vase sau vase duplicate pentru fiecare tratament (fiecare vas conținând 3 masculi și 3 femele). Expunerea se realizează timp de 21 de zile, iar prelevarea de probe de la pești se efectuează în cea de a 21-a zi de expunere. Fertilitatea cantitativă este monitorizată zilnic.

12. După prelevarea de probe în cea de a 21-a zi, toate animalele sunt eutanasiate. Caracteristicile sexuale secundare se măsoară în cazul *Pimephales promelas* și în cazul *Oryzias latipes* (a se vedea appendicele 5A și appendicele 5B); se prelevează probe de sânge pentru determinarea vitelogeninei de la peștele-zebră și de la *Pimephales promelas*, ca alternativă se pot preleva probe de la cap/coadă pentru determinarea vitelogeninei la peștele-zebră (appendicele 6); pentru măsurarea VTG în cazul *Oryzias latipes* se prelevează probe din ficat (appendicele 6); gonadele sunt fixate fie în întregime sau disecate pentru o eventuală evaluare histopatologică (22).

CRITERIILE DE ACCEPTARE A TESTULUI

13. Pentru ca rezultatele testului să fie acceptabile, acesta trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- mortalitatea din vasele de control cu apă (sau cu solvent) nu trebuie să depășească 10 procente la sfârșitul perioadei de expunere;
- concentrația oxigenului dizolvat trebuie să fie pe toată durata testului de cel puțin 60 % din valoarea de saturație din aer (VSA);
- temperatura apei nu trebuie să difere cu mai mult de $\pm 1,5$ °C între vasele de testare în niciun moment pe parcursul perioadei de expunere și trebuie să fie menținută într-un interval de 2 °C în limitele de temperatură specificate pentru speciile testate (appendicele 2);
- trebuie să existe dovezi care să demonstreze menținerea satisfăcătoare a concentrațiilor substanței utilizate în test în intervalul de ± 20 % din valorile medii măsurate;
- dovezi că peștii eliberează gameți în mod activ în toate vasele duplicate înainte de inițierea expunerii la substanța de testat și în toate vasele de control duplicate pe parcursul testului.

DESCRIEREA METODEI

Aparatura

14. Echipamentul obișnuit de laborator și, în special, următoarele:
- a. aparat de măsurare a oxigenului și pH-metru;
 - b. echipament pentru determinarea durității și alcalinității apei;
 - c. aparatură adecvată pentru controlul temperaturii, de preferat cu monitorizare continuă;
 - d. bazine din material chimic inert și de capacitate adaptată la încărcarea și la densitatea populației recomandate (a se vedea appendicele 2);
 - e. substrat de reproducere pentru *Pimephales promelas* și peștele-zebră; appendicele 4 conține detaliile necesare;
 - f. balanță cu precizie adecvată (adică precizie de $\pm 0,5$ mg).

Apa

15. În cadrul testului poate fi utilizat orice tip de apă în care specia testată supraviețuiește și crește o perioadă îndelungată corespunzătoare. Apa trebuie să fie de calitate constantă pe durata testului. Aceasta trebuie să aibă un pH cuprins în intervalul 6,5-8,5, dar pe durata unui test pH-ul trebuie să se încadreze într-un interval de $\pm 0,5$ unități. Pentru a garanta faptul că apa de diluție nu influențează în mod negativ rezultatul testului (de exemplu, prin formarea de complecși ai substanței chimice utilizate în testare) trebuie prelevate periodic probe pentru analiză. De exemplu, la fiecare trei luni trebuie măsurate metale grele (ex., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, și Ni), anioni și cationi majori (ex., Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- și SO_4^{2-}), pesticide (de exemplu, organofosforice totale și organoclorurate totale), carbon organic total și solide în suspensie în cazul în care apa de diluție este cunoscută ca fiind de o calitate relativ constantă. Dacă s-a demonstrat că apa are calitate constantă pe parcursul unei perioade de cel puțin un an, analizele se pot efectua la intervale mai mari (de exemplu, la fiecare șase luni). Anumite caracteristici chimice ale unei ape de diluție acceptabile sunt prezentate în apendicele 3.

Soluții de testare

16. Soluțiile de testare în concentrațiile date se prepară prin diluarea unei soluții stoc. Soluția stoc se prepară de preferință prin simpla amestecare sau agitare a substanței de testare în apa de diluție utilizând mijloace mecanice (de exemplu, un agitator sau cu ajutorul ultrasunetelor). Pentru obținerea unei soluții stoc cu o concentrație corespunzătoare se pot folosi coloane de saturare (coloane de solubilitate). Nu se recomandă utilizarea unui solvent purtător. Cu toate acestea, în cazul în care este necesară utilizarea unui solvent, trebuie testat în paralel un vas de control cu solvent la aceeași concentrație precum cea a substanțelor chimice utilizate în tratamente. În cazul substanțelor chimice care sunt dificil de testat, un solvent poate constitui cea mai bună soluție din punct de vedere tehnic; trebuie consultat documentul de orientare al OCDE privind testarea toxicității acvatică a substanțelor și amestecurilor dificile (23). Alegerea solventului va fi determinată de proprietățile chimice ale substanței sau amestecului. Documentul de orientare al OCDE recomandă să nu se depășească o concentrație maximă de 100 $\mu\text{l/l}$. Cu toate acestea, o analiză recentă (24) a evidențiat preocupări suplimentare generate de utilizarea solvenților pentru testarea activității endocrine. Prin urmare, se recomandă reducerea la minimum a concentrației solventului, dacă este necesar, atunci când este posibil din punct de vedere tehnic (în funcție de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice de testare).
17. Va fi utilizat un sistem de testare cu flux continuu. Un astfel de sistem alimentează și diluează continuu o soluție stoc conținând substanța chimică de testare (de exemplu, pompă dozatoare, diluator proporțional, sistem de saturare) pentru a furniza o serie de concentrații în incintele de testare. Debitul soluțiilor stoc și ale apei de diluție trebuie verificate periodic, de preferință zilnic, pe durata testului și trebuie să nu varieze cu mai mult de 10 % pe parcursul întregului test. Trebuie evitată utilizarea unor tuburi din plastic de calitate inferioară sau a altor materiale care pot conține substanțe biologice active. În momentul selectării materialului pentru sistemul de testare cu flux continuu, trebuie luată în considerare posibila adsorbție a substanței de testare de materialul respectiv.

Manipularea peștilor

18. Peștii de testare trebuie selectați dintr-o populație de laborator, de preferință dintr-un singur stoc, care a fost aclimatizată timp de cel puțin două săptămâni înainte de test în condiții de calitate a apei și de expunere la lumină similare celor utilizate în test. Este important ca rata de încărcare și densitatea populației (pentru definiții, a se vedea apendicele 1) să fie adecvate pentru speciile utilizate în cadrul testului (a se vedea apendicele 2).
19. După o perioadă de aclimatizare de 48 de ore, se înregistrează mortalitățile și se aplică următoarele criterii:
- mortalități mai mari de 10 % din populație în șapte zile: se respinge întregul lot;
 - mortalități între 5 % și 10 % din populație: aclimatizare timp de alte șapte zile; dacă mortalitatea este mai mare de 5 % în cursul celei de a doua perioade de șapte zile, se respinge întregul lot;
 - mortalități mai mici de 5 % din populație în șapte zile: se acceptă întregul lotul.
20. Peștii nu trebuie tratați de boli pe parcursul perioadei de aclimatizare, în perioada de preexpunere sau pe parcursul perioadei de expunere.

Preexpunerea și selectarea peștilor

21. Se recomandă o perioadă de preexpunere de o săptămână pe parcursul căreia animalele sunt introduse în vase similare cu cele utilizate în cadrul testului propriu-zis. Peștii trebuie hrăniți *ad libitum* pe parcursul întregii perioade de reținere și în faza de expunere. Faza de expunere începe cu pești adulți dimorfici din punct de vedere sexual selectați dintr-o populație de animale de laborator mature din punct de vedere reproductiv (de exemplu, prezentând caracteristici sexuale secundare clare, vizibile în cazul *Pimephales promelas* și al *Oryzias latipes*) și care eliberează activ gameți. Exclusiv pentru o orientare generală (și fără ca acest fapt să fie luat în considerare independent de observarea stadiului efectiv de reproducere al unui anumit lot de pești), *Pimephales promelas* trebuie să aibă aproximativ 20 (± 2) săptămâni, presupunând că au fost crescuți la o temperatură de 25 ± 2 °C pe parcursul întregii lor vieți. *Oryzias latipes* trebuie să aibă aproximativ 16 (± 2) săptămâni, presupunând că au fost crescuți la o temperatură de 25 ± 2 °C pe parcursul întregii lor vieți. Peștii-zebră trebuie să aibă aproximativ 16 (± 2) săptămâni, presupunând că au fost crescuți la 26 ± 2 °C pe parcursul întregii lor vieți. Producția de ouă trebuie evaluată zilnic pe parcursul fazei de preexpunere. Se recomandă ca eliberarea gameților să fie observat în toate bazinele duplicat înainte de includerea în faza de expunere a testului. Orientări cantitative privitoare la producția zilnică oportună de ouă nu pot fi furnizate în acest stadiu, dar s-a observat o medie mai mare de 10 ouă/femelă/zi pentru fiecare specie. Un protocol de dispunere aleatorie a blocurilor, conform ratei de producție a ouălor, trebuie folosit pentru a repartiza duplicatele diverselor niveluri de testare în vederea asigurării unei distribuiri echilibrate a duplicatelor.

PROTOCOLUL TESTULUI

22. Se utilizează trei concentrații ale substanței chimice de testare, un vas de control (apă) și, dacă este necesar, un vas de control cu solvent. Datele pot fi analizate pentru a determina diferențele semnificative din punct de vedere statistic între răspunsurile corespunzătoare vaselor supuse tratamentului și vaselor de control. Aceste analize vor oferi informații cu privire la necesitatea efectuării unor teste suplimentare pe termen mai lung pentru a se detecta posibile efecte adverse (și anume, asupra supraviețuirii, dezvoltării, creșterii și reproducerii) ale substanței chimice, mai degrabă decât pentru utilizare în cadrul evaluării riscurilor (25).
23. În cazul peștelui-zebră, în cea de a 21-a zi a experimentului, sunt prelevate probe de la masculii și femelele din fiecare nivel de tratament (5 masculi și 5 femele din fiecare dintre cele două vase duplicat) și din vasul sau vasele de control pentru a măsura vitelogenina. În cazul *Oryzias latipes*, în cea de a 21-a zi a experimentului, sunt prelevate probe de la masculii și femelele din fiecare nivel de tratament (3 masculi și 3 femele din fiecare dintre cele patru vase duplicat) și din vasul sau vasele de control pentru a măsura vitelogenina și a evalua caracteristicile sexuale secundare. În cazul *Pimephales promelas*, în cea de a 21-a zi de expunere, sunt prelevate probe de la masculii și femelele (2 masculi și 4 femele din fiecare dintre cele patru vase duplicat) și din vasul sau vasele de control pentru a măsura vitelogenina și a evalua caracteristicile sexuale secundare. Evaluarea cantitativă a fecundității este necesară, iar țesuturile gonadelor trebuie fixate în întregime sau disecate pentru o posibilă evaluare histopatologică, dacă este necesar.

Selectarea concentrațiilor de testare

24. În scopurile acestui test, cea mai mare concentrație de testare trebuie stabilită fie la concentrația maximă tolerată (CMT), obținută cu ajutorul unei metode de determinare a intervalului sau din alte date privind toxicitatea, fie la valoarea de 10 mg/l, fie la valoarea corespunzătoare solubilității maxime în apă, oricare este cea mai mică. CMT este definită ca fiind cea mai mare concentrație de testare a substanței chimice având ca rezultat o rată a mortalității mai mică de 10 %. Utilizarea acestei metode presupune existența unor date empirice privind toxicitatea acută sau a altor date privind toxicitatea pe baza cărora poate fi estimată CMT. Estimarea CMT poate fi inexactă și, în general, necesită o anumită judecată profesională.
25. Sunt necesare trei concentrații de testare, diferențiate printr-un factor constant care nu depășește valoarea 10, un control cu apă de diluție (și un control cu solvent, dacă este necesar). Se recomandă ca factorii de diferențiere să se încadreze în intervalul 3,2 și 10.

MOD DE OPERARE

Selectarea și cântărirea peștilor pentru testare

26. Este important ca diferențele de greutate între pești să fie reduse la minim la începutul testului. În apendicele 2 sunt prezentate intervalele recomandate de mărime corespunzătoare diferitelor specii pentru acest test. Pentru întregul lot de pești utilizați în cadrul testului, intervalul greutateilor individuale ale masculilor și femelelor la începutul testului trebuie menținut, dacă este posibil, în limita de $\pm 20 \%$ din media aritmetică a greutateii fiecărui sex. Se recomandă cântărirea unui subșantion din stocul de pești înainte de testare pentru a estima greutatea medie.

Condiții de expunere*Durată*

27. Durata testului este de 21 de zile, după o perioadă de preexpunere. Perioada de preexpunere recomandată este de una până la două săptămâni.

Hrănirea

28. Peștii trebuie hrăniți *ad libitum* cu hrană corespunzătoare (apendicele 2) într-o cantitate suficientă pentru menținerea condiției fizice. Trebuie evitată proliferarea microbilor și apariția turbidității apei. Ca orientare generală, rația zilnică poate fi împărțită în două sau trei porții egale administrate de mai multe ori pe zi, la intervale de cel puțin trei ore. Se acceptă o singură rație mai mare, în special în weekend-uri. Peștii nu trebuie hrăniți timp de 12 ore înainte de prelevarea probelor/necropsie.
29. Hrana peștilor trebuie evaluată pentru a detecta contaminanți precum pesticide organoclorurate, hidrocarburi aromatice policiclice (HAP), bifenili policlorurați (BPC). Trebuie evitate alimentele cu un nivel înalt de fitoestrogeni care ar compromite răspunsul în cadrul testului la un agonist de estrogen cunoscut (de exemplu, 17 β -estradiol).
30. Hrana neconsumată și materiile fecale trebuie înlăturate din vasele de testare cel puțin de două ori pe săptămână, de exemplu prin curățarea cu grijă a fundului fiecărui bazin cu ajutorul unui sifon.

Lumina și temperatura

31. Perioada de expunere la lumină și temperatura apei trebuie să fie adecvate pentru specia testată (apendicele 2).

Frecvența determinărilor și măsurătorilor analitice

32. Înainte de începerea perioadei de expunere, trebuie asigurată funcționarea corespunzătoare a sistemului de alimentare cu substanța chimică. Trebuie stabilite toate metodele analitice necesare, inclusiv cunoștințe suficiente privind stabilitatea substanței chimice în sistemul de testare. Pe parcursul testului, concentrațiile substanței chimice de testare sunt determinate la intervale regulate, după cum urmează: debitul diluantului și cel a soluției stoc toxice trebuie verificate, de preferat zilnic, însă de cel puțin două ori pe săptămână, iar aceste fluxuri nu trebuie să varieze cu mai mult de 10 % pe întreaga durată a testului. Se recomandă măsurarea concentrațiilor efective ale substanței chimice de testare în toate vasele la începutul testului și, ulterior, săptămânal.
33. Se recomandă ca rezultatele să fie fundamentate pe concentrații măsurate. Cu toate acestea, în cazul în care concentrația substanței de testare în soluție a fost menținută în mod satisfăcător pe tot parcursul testului într-un interval de $\pm 20 \%$ din concentrația nominală, rezultatele pot fi fundamentate fie pe valorile nominale, fie pe cele măsurate.

34. Poate fi necesară filtrarea probelor (de exemplu, cu ajutorul unui filtru cu pori de 0,45 µm) sau centrifugarea lor. Dacă este necesar, procedura recomandată este centrifugarea. Cu toate acestea, dacă materialul de testare nu se adsoarbe în filtre, filtrarea este acceptabilă în egală măsură.
35. Pe parcursul testului, oxigenul dizolvat, temperatura și pH-ul trebuie măsurate în toate vasele de testare cel puțin o dată pe săptămână. Duritatea totală și alcalinitatea trebuie măsurate cel puțin o dată pe săptămână în toate vasele de control și în vasul cu cea mai înaltă concentrație. Este de preferat ca temperatura să fie monitorizată continuu cel puțin într-unul din bazine.

Observații

36. O serie de aspecte generale (de exemplu, supraviețuirea) și răspunsuri biologice (de exemplu, nivelurile de vitelogenină) sunt evaluate pe parcursul testului sau la încheierea acestuia. Este necesară monitorizarea cantitativă zilnică a fecundității. Măsurarea și evaluarea acestor puncte finale și utilitatea lor sunt descrise în continuare.

Supraviețuirea

37. Peștii trebuie examinați zilnic pe parcursul perioadei de testare și orice caz de deces trebuie înregistrat, iar peștii morți trebuie îndepărtați cât mai rapid posibil. Peștii morți nu trebuie înlocuiți în vasele de control sau în vasele de tratament. Sexul peștilor morți în timpul testului trebuie stabilit printr-o evaluare macroscopică a gonadelor.

Comportament și aspect

38. Trebuie notat orice comportament anormal (în raport cu grupul de control); acesta ar putea include semne ale toxicității generale, inclusiv hiperventilație, înotul necoordonat, pierderea echilibrului, imobilitate sau hrănire atipică. De asemenea, trebuie observate anomalii externe (precum hemoragia, modificările de culoare). Astfel de semne de toxicitate trebuie luate în considerare cu atenție în timpul interpretării datelor, întrucât acestea pot indica concentrații la care biomarkerii activității endocrine nu sunt fiabili. Observațiile referitoare la comportament pot furniza, de asemenea, informații calitative utile pentru a sta la baza unor posibile viitoare cerințe în materie de testare a peștilor. De exemplu, a fost observată o agresivitate teritorială la masculii normali sau la femele masculinizate de *Pimephales promelas* prin expunere la androgenice; în cazul peștelui-zebră, comportamentul caracteristic de împerechere și de eliberare de gameți după răsăritul soarelui este redus sau afectat de expunerea la estrogenice sau la antiandrogenice.
39. Deoarece anumite elemente legate de aspect (în primul rând culoarea) se pot modifica rapid în timpul manipulării, este important să se realizeze observații calitative înainte de eliminarea animalelor din sistemul de testare. Experiența de până în prezent în ceea ce privește *Pimephales promelas* sugerează că anumite substanțe chimice care acționează la nivel endocrin pot induce inițial modificări ale următoarelor caracteristici exterioare: culoarea corpului (deschisă sau închisă), modele de colorație (prezența unor dungi verticale) și forma corpului (regiunea capului și regiunea pectorală). Prin urmare, trebuie realizate observații privind aspectul fizic al peștilor pe parcursul testului și la încheierea studiului.

Fecunditate

40. Trebuie înregistrate observații cantitative zilnice legate de eliberarea de gameți per duplicat. Producția de ouă trebuie să fie înregistrată ca numărul de ouă/femelă supraviețuitoare/zi per duplicat. Ouăle vor fi îndepărtate zilnic din camerele de testare. Substraturile de reproducere trebuie amplasate în camera de testare în cazul *Pimephales promelas* și în cazul peștelui-zebră pentru a permite peștilor să elibereze gameți în condiții normale. Apendicele 4 oferă detalii suplimentare privind substraturile de reproducere recomandate pentru peștele-zebră (apendicele 4a) și pentru *Pimephales promelas* (anexa 4b). Nu se consideră necesar să se prevadă un substrat de reproducere în cazul *Oryzias latipes*.

Eutanasierea peștilor

41. În ziua 21, și anume la încheierea perioadei de expunere, peștii trebuie eutanasiați cu ajutorul unor cantități corespunzătoare de tricaină (metan sulfonat de tricaină, metacaină, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l tamponată cu 300 mg/l NaHCO₃ (bicarbonat de sodiu, CAS 144-55-8) pentru a reduce iritația mucoaselor; apoi sunt prelevate probe de sânge sau de țesut pentru determinarea vitelogeninei, conform explicațiilor din secțiunea privind vitelogenina.

Observarea caracteristicilor sexuale secundare

42. Anumite substanțe chimice care acționează la nivel endocrin pot induce modificări ale caracteristicilor sexuale secundare specializate (numărul de tuberculi nupțiali la masculul *Pimephales promelas*, procesele papilare la masculul de *Oryzias latipes*). În special, substanțele chimice cu anumite moduri de acțiune pot cauza apariția anormală a unor caracteristici sexuale secundare la animalele de sex opus; de exemplu, agoniști ai receptorilor androgenici, cum ar fi trenbolonul, metiltestosteronul și dihidrotestosteronul pot cauza dezvoltarea de tuberculi nupțiali proeminenți la femelele de *Pimephales promelas* sau dezvoltarea de procese papilare la femelele de *Oryzias latipes* (11, 20, 21). De asemenea, s-a raportat faptul că agoniștii receptorilor estrogenici pot reduce numărul de tuberculi nupțiali și dimensiunea depozitelor subcutanate dorsale ale masculilor adulți de *Pimephales promelas* (26, 27). Aceste observații morfologice macroscopice pot furniza informații calitative și cantitative utile pentru a sta la baza unor posibile viitoare cerințe privind testarea peștilor. Numărul și dimensiunea tuberculelor nupțiale ai *Pimephales promelas* și ale proceselor papilare ale *Oryzias latipes* pot fi cuantificate direct sau, mai practic, în eșantioanele conservate. Procedurile recomandate pentru evaluarea caracteristicilor sexuale secundare la *Pimephales promelas* și la *Oryzias latipes* sunt disponibile în apendicele 5A și, respectiv, apendicele 5B.

Vitelogenina (VTG)

43. Se prelevează sânge din artera/vena caudală cu un tub capilar microhematocrit heparinizat sau, alternativ, printr-o puncție cardiacă cu ajutorul unei seringi. În funcție de mărimea peștelui, volumul de sânge prelevat se încadrează în general între 5 și 60 μ l pe individ în cazul *Pimephales promelas* și între 5 și 15 μ l pe individ în cazul peștelui-zebră. Plasma este separată de sânge prin centrifugare și este depozitată cu inhibitori de protează la o temperatură de -80°C până când este analizată pentru a măsura vitelogenina. Alternativ, în cazul *Oryzias latipes* se va utiliza ficatul, iar în cazul peștelui-zebră, omogenatul de cap/coadă poate fi utilizat ca țesut-sursă pentru determinarea vitelogeninei (apendicele 6). Măsurarea VTG trebuie să se bazeze pe o metodă ELISA omoloagă validată, utilizând un standard omolog de VTG și anticorpi omologi. Se recomandă utilizarea unei metode capabile să detecteze nivelurile de VTG de ordinul a câteva ng/ml de plasmă (sau ng/mg de țesut), care reprezintă nivelul de fond la masculii neexpuși.
44. Controlul calității măsurării vitelogeninei se va realiza prin utilizarea de soluții standard, de probe-martor și cel puțin de analize duplicate. Pentru fiecare metodă ELISA, trebuie efectuat un test al efectului matricial (efectul de diluție a probei) pentru a determina factorul de diluție minimă a probei. Fiecare placă ELISA utilizată pentru testele VTG trebuie să includă următoarele probe de control al calității: cel puțin 6 soluții standard de calibrare care acoperă intervalul de concentrații de vitelogenină preconizate și cel puțin o probă-martor de testare de legare nespecifică (analizată în duplicat). Absorbanța acestor probe-martor trebuie să fie mai mică de 5 % din absorbanța maximă a soluțiilor standard de calibrare. Vor fi analizate cel puțin două alicote (duplicate godeu) din fiecare diluție a probei. Duplicatele godeu care diferă cu un procent mai mare de 20 % trebuie reanalizate.
45. Coeficientul de corelație (R^2) al curbelor de calibrare trebuie să fie mai mare de 0,99. Cu toate acestea, o corelație mare nu este suficientă pentru a garanta o predicție adecvată a concentrației pentru toate intervalele. Pe lângă o corelație suficient de mare pentru curba de calibrare, concentrația fiecărei soluții standard, calculată pornind de la curba de calibrare, trebuie să se încadreze între 70 % și 120 % din concentrația sa nominală. În cazul în care concentrațiile nominale tind să se îndepărteze de linia de regresie a calibrării (de exemplu, spre concentrații mai mici), poate fi necesară împărțirea curbei de calibrare în intervale de concentrații mici și mari sau utilizarea unui model neliniar pentru a ajusta în mod adecvat datele privind absorbanța. În cazul împărțirii curbei, ambele segmente de linie trebuie să aibă valoarea $R^2 > 0,99$.
46. Limita de detecție (LOD) este definită ca fiind cea mai mică concentrație a soluției standard analitice, iar limita de cuantificare (LOQ) este definită ca fiind cea mai mică concentrație a soluției standard analitice înmulțită cu cel mai mic factor de diluție.
47. În fiecare zi în care sunt efectuate măsurări ale vitelogeninei se va analiza o probă fortificată utilizând un standard de referință intertest (apendicele 7). Raportul dintre concentrația preconizată și concentrația măsurată va fi raportat împreună cu rezultatele fiecărui set de teste efectuate în ziua respectivă.

Evaluarea histopatologică a gonadelor

48. Autoritățile de reglementare pot solicita efectuarea unei analize histopatologice a gonadelor în vederea studierii organului țintă pe axul HPG în urma expunerii la substanța chimică. În acest sens, gonadele sunt fixate fie în întregime, fie disecate. În cazul în care examenul histopatologic este necesar, se vor căuta anumite răspunsuri cu caracter endocrin în evaluarea activității endocrine a substanței chimice testate. Aceste răspunsuri de diagnosticare includ, în principal, prezența oocitelor testiculare, hiperplazia celulei Leydig, spermatogonie mărită și hiperplazia zonei perifoliculare. Alte leziuni ale gonadei precum atrezia oocitelor, degenerarea testiculară și schimbările de stadiu pot avea la bază cauze diverse. Documentul de orientare privind examinarea histopatologică a gonadelor de pește precizează procedurile care vor fi utilizate la disecția, fixarea, secționarea și examinarea histopatologică a gonadelor (22).

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea răspunsurilor biomarkerilor prin analiza varianței (ANOVA)

49. Pentru a identifica activitatea potențială a unei substanțe chimice, răspunsurile grupurilor tratate sunt comparate cu cele ale grupurilor de control utilizând analiza varianței (ANOVA). În cazul în care se utilizează un solvent de control, trebuie efectuat un test statistic corespunzător între apa de diluție și solventul de control pentru fiecare parametru final studiat. Orientări cu privire la interpretarea datelor referitoare la apa de diluție și solventul de control în cadrul analizei statistice ulterioare sunt disponibile în OCDE, 2006c (28). Toate datele privind răspunsurile biologice trebuie analizate și raportate separat per sex. Dacă nu sunt îndeplinite ipotezele necesare pentru metodele parametrice — distribuție anormală (de exemplu, testul Shapiro-Wilk) sau varianță eterogenă (testul Barlett sau testul Levene) — trebuie luată în considerare transformarea datelor în scopul omogenizării varianțelor înainte de efectuarea analizei varianței sau efectuarea unei analize ponderate a varianței. Testul Dunnett (parametric) care permite comparații multiple pe perechi sau testul Mann-Whitney cu ajustarea Bonferroni (neparametrică) poate fi utilizat pentru un raport doză-răspuns nemonoton. Pot fi utilizate alte teste statistice (de exemplu, testul Jonckheere-Terpstra sau testul Williams) în cazul în care raportul doză-răspuns este aproximativ monoton. În apendicele 8 este furnizată o diagramă statistică pentru a contribui la luarea unei decizii cu privire la alegerea testului statistic cel mai adecvat pentru a fi utilizat. Informații suplimentare pot fi obținute, de asemenea, din Documentul OCDE privind metodele actuale de analiză statistică a datelor de ecotoxicitate (28).

Raportarea rezultatelor testului

50. Datele studiului trebuie să includă:

Facilitatea de testare:

- Personalul responsabil și responsabilitățile sale în cadrul studiului
- Fiecare laborator trebuie să își fi demonstrat competența prin utilizarea unei game de substanțe chimice reprezentative

Substanța chimică de testare:

- Caracterizarea substanței chimice de testare
- Natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante
- Metoda și frecvența preparării concentrațiilor de testare
- Informații privind stabilitatea și biodegradabilitatea

Solventul:

- Caracterizarea solventului (natura, concentrația utilizată)
- Justificarea alegerii solventului (în cazul în care acesta nu este apa)

Animalele de testare:

- Specia și subspecia
- Furnizorul și unitatea specifică a furnizorului
- Vârsta peștilor la începutul testului și stadiul de reproducere/de eliberare a gameților
- Detalii cu privire la procedura de acclimatizare a animalelor
- Greutatea corporală a peștilor la începutul expunerii (dintr-un subșantion din stocul de pești)

Condiții de testare:

- Procedura de testare utilizată (tipul testului, rata de încărcare, densitatea populației etc.);
- Metoda de preparare a soluțiilor stoc și debitul;
- Concentrațiile nominale de testare, concentrațiile soluțiilor de testare testate săptămânal și metoda analitică utilizată, mediile valorilor măsurate și deviațiile standard în vasele de testare și dovada faptului că măsurătorile se referă la concentrațiile substanței chimice de testare în soluție reală;
- Caracteristicile apei de diluție (incluzând pH, duritate, alcalinitate, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat, nivelurile de clor rezidual, carbonul organic total, solidele în suspensie și orice altă măsurătoare efectuată)
- Calitatea apei din vasele de testare: pH, duritate, temperatură și concentrația oxigenului dizolvat;
- Informații detaliate privind hrănirea [de exemplu, tipul de aliment (alimente), sursa, cantitatea furnizată, frecvența și analizele privind contaminanți relevanți, dacă sunt disponibile (de exemplu, BPC, HAP și pesticide organoclorurate)].

Rezultate

- Dovada că soluțiile de control îndeplinesc criteriile de acceptare a testului;
- Datele privind mortalitățile pentru fiecare nivel de concentrație de testare și pentru fiecare control;
- Tehnicile de analiză statistică utilizate, prelucrarea datelor și justificarea tehnicilor utilizate;
- Datele privind observațiile biologice de morfologie macroscopică, inclusiv caracteristicile sexuale secundare, producția de ouă și vitelogenina;
- Rezultatele analizelor datelor, de preferință sub formă de tabele și de grafice;
- Incidența oricărei reacții neobișnuite a peștilor și a oricărui efect vizibil provocat de substanța chimică de testare

ORIENTĂRI PENTRU INTERPRETAREA ȘI ACCEPTAREA REZULTATELOR TESTULUI

51. Această secțiune include unele considerații care trebuie avute în vedere pentru interpretarea rezultatelor testului în ceea ce privește diferiții parametri măsurați. Rezultatele trebuie interpretate cu precauție în cazul în care substanța chimică de testare pare a cauza semne evidente de toxicitate sau a afecta starea generală a animalului testat.
52. La stabilirea intervalului de concentrații de testare, nu trebuie să se depășească concentrația maximă tolerată pentru a permite o interpretare corespunzătoare a datelor. Este important să se aplice cel puțin un tratament care să nu prezinte semne ale unor efecte toxice. Semnele de boală și semnele unor efecte toxice trebuie evaluate și raportate în detaliu. De exemplu, producția de VTG la femele poate fi afectată, de asemenea, de toxicitatea generală și de modurile de acțiune toxice non-endocrine, de exemplu hepatotoxicitate. Cu toate acestea, interpretarea efectelor poate fi consolidată prin alte niveluri de tratament care nu sunt afectate de toxicitatea sistemică.

53. Există unele aspecte care trebuie luate în considerare pentru acceptarea rezultatelor testului. Cu titlu orientativ, nivelurile de VTG la grupele de control de masculi și de femele trebuie să fie distincte și separate de aproximativ trei ordine de mărime în cazul *Pimephales promelas* și al peștelui-zebră și de aproximativ un ordin de mărime în cazul *Oryzias latipes*. Exemple ale intervalului de valori întâlnite la grupele de control și la cele tratate sunt disponibile în rapoartele de validare (1, 2, 3, 4). Valori mari ale VTG la masculii din grupele de control ar putea compromite performanța testului și capacitatea acestuia de a detecta agonistii estrogenici slabi. Valori mici ale VTG la femelele din grupele de control ar putea compromite performanța testului și capacitatea acestuia de a detecta inhibitorii aromatazei și antagoniștii estrogenici. Studiile de validare au fost utilizate pentru a elabora orientarea respectivă.
54. În ceea ce privește cuantificarea producției de ouă, aceasta este supusă unor variații importante [coeficientul de variație (CV) poate varia de la 20 la 60 %] care afectează capacitatea testului de a detecta o scădere semnificativă a producției de ouă mai mică decât 70 % pe măsură ce valoarea CV se apropie de 50 % sau mai mult. Atunci când CV este limitat la valori mai scăzute (în jur de 20-30 %), testul va avea o putere acceptabilă (80 %) pentru a detecta o scădere cu 40-50 % a producției de ouă. Conceperea testului utilizat pentru *Pimephales promelas*, care include patru duplicate pentru fiecare nivel de tratament, ar trebui să acorde mai multă putere parametrului de fecunditate, în comparație cu un test cu doar două duplicate.
55. În cazul în care un laborator nu a mai realizat testul anterior sau au fost efectuate modificări substanțiale (de exemplu, schimbarea subspeciei sau a furnizorului de pești), se recomandă efectuarea unui studiu de competență tehnică. Se recomandă utilizarea unor substanțe chimice care prezintă o gamă de moduri de acțiune sau de impacturi asupra unor parametri studiați. Practic, fiecare laborator este încurajat să își elaboreze propriile date istorice de control pentru masculi și femele și să efectueze teste cu o substanță chimică de control pozitivă pentru activitatea estrogenică (de exemplu, 17 β -estradiol la 100 ng/l sau un agonist slab cunoscut) având ca rezultat creșterea VTG la masculi, cu o substanță de control pozitiv în vederea inhibării aromatazei (de exemplu, fadrozol sau procloraz la 300 μ g/l) având ca rezultat scăderea VTG la femele și cu o substanță chimică de control pozitiv pentru activitatea androgenică (de exemplu 17 β -trenbolonul la 5 μ g/l) având ca rezultat inducerea caracteristicilor sexuale secundare la femelele de *Pimephales promelas* și de *Oryzias latipes*. Toate aceste date pot fi comparate cu datele disponibile din studiile de validare (1, 2, 3) pentru a garanta competența laboratorului.
56. În general, măsurătorile vitelogeninei trebuie considerate pozitive în cazul unei creșteri semnificative statistic a VTG la masculi ($p < 0.05$) sau în cazul unei scăderi semnificative statistic la femele ($P < 0.05$) cel puțin la doza maximă testată în comparație cu grupul de control și în absența semnelor de toxicitate generală. Un rezultat pozitiv este confirmat suplimentar prin demonstrarea unei relații plauzibile din punct de vedere biologic între doză și curba răspunsurilor. Astfel cum s-a menționat anterior, scăderea vitelogeninei poate să nu fie în totalitate de origine endocrină; cu toate acestea, un rezultat pozitiv trebuie să fie interpretat, în general, ca o dovadă a activității endocrine *in vivo* și trebuie să genereze în mod normal acțiuni pentru clarificări suplimentare.
57. Evaluarea histopatologică a gonadelor poate fi solicitată de autoritățile de reglementare pentru a determina capacitatea de reproducere a animalelor testate și pentru a permite realizarea unei evaluări probatorii a rezultatelor testului. Efectuarea examinării histopatologice a gonadelor se poate dovedi de prisos în cazul unor valori pozitive ale VTG sau ale caracteristicilor sexuale secundare (și anume, creșterea sau scăderea VTG sau inducerea caracteristicilor sexuale secundare).

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) OCDE (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, Paris.
- (2) OCDE (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, Paris.
- (3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, Paris.

- (4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (accessed 18/09/08).
- (5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.
- (6) OECD (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, Paris.
- (7) Sumpter J.P. and S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*; 103 Suppl 7:173-8 Review.
- (8) Pawlowski S., et al. (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17 α -methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*; 68(3):277-91.
- (9) Andersen L., et al. (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*; 76(3-4):343-52.
- (10) Ankley G.T., et al. (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*; 67(1):121-30.
- (11) Panter G.H., et al. (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*; 70(1):11-21.
- (12) Parks L.G., et al. (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 123(2):113-25.
- (13) Panter G.H., et al. (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.
- (14) Fenske M., et al. (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
- (15) Holbech H., et al. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119-131
- (16) Rose J., et al. (2002). Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C*. 131: 531-539.
- (17) Brion F., et al. (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; vol 21: 1699-1708.
- (18) Yokota H., et al. (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in *Oryzias latipes* (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87-98.
- (19) Tatarazako N., et al. (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the *Oryzias latipes*. *Journal of Health Science* 50:301-308.
- (20) Ankley G.T., et al. (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17 β -trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22(6): 1350-60.

-
- (21) Seki M, et al (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23(3):774-81.
- (22) OCDE (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123, Paris.
- (23) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris
- (24) Hutchinson T.H., et al. (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; pp.69–92.
- (25) Hutchinson T.H., et al. (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts”, not „traffic lights,” in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*; 114 Suppl 1:106-14.
- (26) Miles-Richardson S.R., et al. (1999). Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.
- (27) Martinovic D., et al. (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 478-488.
- (28) OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.
- (29) US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, dated 30 January 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 pp.
- (30) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150, OECD, Paris.
-

Apendicele 1

ABREVIERI ȘI DEFINIȚII

Substanță chimică: o substanță sau un amestec

CV: coeficient de variație

ELISA: test de imunoadsorbtie cu anticorpi marcați enzimatic

Axul HPG: axul hipotalamo-hipofizo-gonadal

Rata de încărcare: greutatea umedă a peștelui per volum de apă.

CMT: concentrația maximă tolerată, reprezentând aproximativ 10 % din CL₅₀ (concentrația letală)

Densitatea populației: numărul de pești pe unitatea de volum de apă.

Substanța chimică de testat: orice substanță sau amestec testat în cadrul acestei metode de testare.

VTG: vitelogenina este o fosfolipoglicoproteină precursoră a proteinelor din vitellus care în mod normal apare la femelele active din punct de vedere sexual din toate speciile ovipare.

Apendicele 2

CONDIȚII EXPERIMENTALE PENTRU TESTUL DE SCREENING ENDOCRIN LA PEȘTI

1. Specii recomandate	<i>Pimephales promelas</i> (<i>Pimephales promelas</i>)	<i>Oryzias latipes</i> (<i>Oryzias latipes</i>)	Peștele-zebră (<i>Danio rerio</i>)
2. Tip de test	În regim dinamic	În regim dinamic	În regim dinamic
3. Temperatura apei	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Calitatea iluminatului	Becuri fluorescente (spectru larg)	Becuri fluorescente (spectru larg)	Becuri fluorescente (spectru larg)
5. Intensitatea luminii	10-20 μE/ m ² /s, 540-1 000 lux, sau 50-100 ft-c (niveluri ambientale de laborator)	10-20 μE/m ² /s, 540-1 000 lux, sau 50-100 ft-c (niveluri ambientale de laborator)	10-20 μE/ m ² /s, 540-1 000 lux, sau 50-100 ft-c (niveluri ambientale de laborator)
6. Perioada de expunere la lumină (tranzițiile răsărit-apus sunt opționale, cu toate acestea nu sunt considerate necesare)	16 h de lumină, 8 h de întuneric	12-16 h de lumină, 12-8 h de întuneric	12-16 h de lumină, 12-8 h de întuneric
7. Rata de încărcare	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Dimensiunea camerelor de testare	10 (minimum)	2 (minimum)	5 (minimum)
9. Volumul soluției de testare	8 (minimum)	1.5 (minimum)	4 (minimum)
10. Volumele soluțiilor de testare schimbate	Minimum 6/zi	Minimum 5/zi	Minimum 5/zi
11. Vârsta organismelor testate	A se vedea punctul 21.	A se vedea punctul 21.	A se vedea punctul 21.
12. Greutatea umedă aproximativă a peștilor adulți (g)	Femele: 1,5 ± 20 % masculi: 2,5 ± 20 %	Femele: 0,35 ± 20 % masculi: 0,35 ± 20 %	Femele: 0,65 ± 20 % masculi: 0,4 ± 20 %
13. Nr. de pești per vas de testare	6 (2 masculi și 4 femele)	6 (3 masculi și 3 femele)	10 (5 masculi și 5 femele)
14. Nr. de tratamente	= 3 (plus controalele corespunzătoare)	= 3 (plus controalele corespunzătoare)	= 3 (plus controalele corespunzătoare)
15. Nr. de vase per tratament	4 minimum	4 minimum	2 minimum
16. Nr. de pești pentru fiecare concentrație testată	16 femele adulte și 8 masculi adulți (4 femele și 2 masculi în fiecare vas duplicat)	12 femele adulte și 12 masculi adulți (3 femele și 3 masculi în fiecare vas duplicat)	10 femele adulte și 10 masculi adulți (5 femele și 5 masculi în fiecare vas duplicat)

17. Regimul de hrănire	Adulți sau nauplius de Artemia de două sau de trei ori pe zi (<i>ad libitum</i>), hrană disponibilă în comerț sau o combinație a celor menționate	Nauplius de Artemia de două sau trei ori pe zi (<i>ad libitum</i>), hrană disponibilă în comerț sau o combinație a celor menționate	Nauplius de Artemia de două sau trei ori pe zi (<i>ad libitum</i>), hrană disponibilă în comerț sau o combinație a celor menționate
18. Aerarea	Fără aerare, cu excepția cazului în care concentrația de oxigen dizolvat este sub 60 % din valoarea de saturație din aer	Fără aerare, cu excepția cazului în care concentrația de oxigen dizolvat este sub 60 % din valoarea de saturație din aer	Fără aerare, cu excepția cazului în care concentrația de oxigen dizolvat este sub 60 % din valoarea de saturație din aer
19. Apa de diluție	Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită sau apă de la robinet declorizată	Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită sau apă de la robinet declorizată	Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită sau apă de la robinet declorizată
20. Perioada de preexpunere	Perioadă recomandată de 7-14 zile	Perioadă recomandată de 7-14 zile	Perioadă recomandată de 7-14 zile
21. Durata expunerii la substanța chimică	21-d	21-d	21-d
22. Parametri biologici studiați	— supraviețuire — comportament — fecunditate — caracteristici sexuale secundare — VTG — opțional examinare histopatologică a gonadelor	— supraviețuire — comportament — fecunditate — caracteristici sexuale secundare — VTG — opțional examinare histopatologică a gonadelor	— supraviețuire — comportament — fecunditate — VTG — opțional examinare histopatologică a gonadelor
23. Criterii de acceptare a testului	Oxigenul dizolvat ≥ 60 % din saturație; temperatura medie de 25 ± 2 °C; supraviețuire de 90 % la peștii de control; concentrații de testare măsurate menținute în limita a 20 % din media valorilor măsurate pentru fiecare nivel de tratament	Oxigenul dizolvat ≥ 60 % din saturație; temperatura medie de 25 ± 2 °C; supraviețuire de 90 % la peștii de control; concentrații de testare măsurate în limita a 20 % din media valorilor măsurate pentru fiecare nivel de tratament	Oxigenul dizolvat ≥ 60 % din saturație; temperatura medie de 26 ± 2 °C; supraviețuire de 90 % la peștii de control; concentrații de testare măsurate în limita a 20 % din media valorilor măsurate pentru fiecare nivel de tratament

Apendicele 3

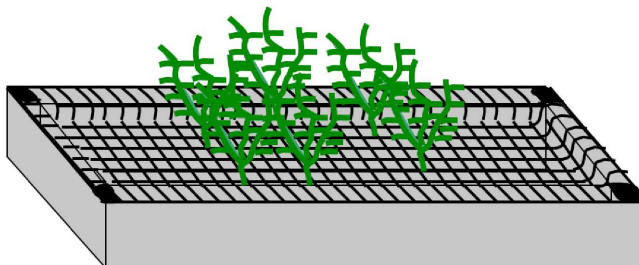
ANUMITE CARACTERISTICI ALE APEI DE DILUȚIE ACCEPTABILE

COMPONENTĂ	CONCENTRAȚII
Particule în suspensie	< 20mg/l
Carbon organic total	< 2mg/l
Amoniac neionizat	< 1μg/l
Clor rezidual	< 10μg/l
Total pesticide organofosforice	< 50ng/l
Total pesticide organoclorurate plus bifenili policlorurați	< 50ng/l
Total clor organic	< 25 ng/l

Apendicele 4A

SUBSTRATUL DE REPRODUCERE PENTRU PEȘTELE-ZEBRĂ

Tavă de reproducere: tavă instrumentară în întregime din sticlă, cu dimensiuni de exemplu de 22 × 15 × 5,5 cm (L × l × î), acoperită cu o sită mobilă din oțel inoxidabil (orificii de 2 mm). Sita trebuie să acopere deschiderea tăvii instrumentare la un nivel situat mai jos decât marginea acesteia.



Substratul de reproducere se fixează pe sită. Se formează o structură în care pot pătrunde peștii. De exemplu, sunt adecvate plante de acvariu artificiale realizate din plastic de culoare verde (NB: trebuie luată în considerare posibila absorbție a substanței chimice de testare în materialul din plastic). Plasticul trebuie să fie curățat cu o cantitate suficientă de apă caldă pentru o perioadă suficientă de timp pentru a se asigura că nicio substanță chimică nu poate pătrunde în apa de testare. Dacă se utilizează materiale din sticlă, trebuie avut grijă ca peștii să nu se rănească sau să se îngheșuie în timpul deplasărilor.

Distanța dintre tavă și pereții din sticlă trebuie să fie de cel puțin 3 cm pentru a se asigura că eliberarea gameților nu se realizează în afara tăvii. Ouăle depuse pe tavă cad printre ochiurile sitei și pot fi prelevate la 45-60 de minute după pornirea iluminării. Ouăle transparente nu sunt adezive și pot fi ușor numărate în condiții de iluminare transversală. Atunci când se utilizează cinci femele pentru fiecare vas, numărul de ouă este considerat mic dacă este de maximum 20 pe zi, mediu dacă este de maximum 100 și mare dacă este peste 100. Tava de reproducere trebuie îndepărtată, ouăle colectate, iar tava de reproducere reintrodusă în vasul de testare, fie seara la o oră cât mai târzie, fie dimineața foarte devreme. Perioada până la reintroducere nu trebuie să depășească o oră, întrucât, în caz contrar, semnalul substratului de reproducere poate induce împerecherea individuală și eliberarea gameților într-un moment neobișnuit. Dacă situația impune introducerea mai târzie a tăvii de reproducere, aceasta trebuie să se efectueze cu cel puțin 9 ore după pornirea iluminării. La această oră târzie din zi, eliberarea gameților nu mai este indusă.

Apendicele 4B

SUBSTRATUL DE REPRODUCERE PENTRU *PIMEPHALES PROMELAS*

Două sau trei plăci sau tăvi de reproducere din plastic/ceramică/sticlă sau oțel inoxidabil combinate sunt așezate în fiecare cameră de testare (de exemplu un jgheab semicircular de culoare gri cu o lungime de 80 mm, așezat pe o tavă cu margini ridicate cu o lungime de 130 mm) (a se vedea imaginea). S-a demonstrat că plăcile din PVC sau din ceramică tratate în mod corespunzător sunt adecvate pentru un substrat de reproducere (Thorpe et al, 2007).

Se recomandă ca plăcile să fie șlefuite pentru a îmbunătăți aderența. Tava trebuie să fie, de asemenea, prevăzută cu un ecran de protecție pentru a împiedica accesul peștilor la ouăle căzute, cu excepția cazului în care eficiența aderenței ouălor a fost demonstrată pentru substratul de reproducere utilizat.



Baza este concepută pentru a reține toate ouăle care nu aderă la suprafața plăcilor și care, în consecință, ar cădea pe fundul bazinului (sau ouăle depuse direct pe baza plană din plastic). Toate substraturile de reproducere trebuie curățate înainte de utilizare timp de cel puțin 12 ore în apă de diluție.

KL Thorpe, Benstead R, Hutchinson, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, 81, 90-98.

Apendicele 5A

EVALUAREA CARACTERISTICILOR SEXUALE SECUNDARE LA *PIMEPHALES PROMELAS* PENTRU
DETECTAREA ANUMITOR SUBSTANȚE CHIMICE CARE ACȚIONEAZĂ LA NIVEL ENDOCRIN

Prezentare generală

În cazul adulților de *Pimephales promelas*, caracteristicile aspectului fizic potențial importante în cadrul testării perturbatorilor endocrini includ culoarea corpului (deschisă/închisă), modelele de colorație (prezența sau absența unor dungi verticale), forma corpului (forma capului și a regiunii pectorale, distensia abdomenului), precum și caracteristicile sexuale secundare specializate (numărul și dimensiunea tuberculilor nupțiali, dimensiunea depozitului subcutanat dorsal și ovipozitorul).

Tuberculii nupțiali sunt situați pe cap (depozit subcutanat dorsal) la masculii de *Pimephales promelas* activi din punct de vedere reproductiv și sunt dispuși de regulă simetric bilateral (Jensen *et al.* 2001). Femelele de control și masculii și femelele tinere nu dezvoltă tuberculi (Jensen *et al.* 2001). La masculi, numărul de tuberculi individuali situați în jurul ochilor și între nări este de maximum opt. Cei mai mulți și mai mari tuberculi sunt așezați sub forma a două șiruri paralele imediat sub nări și deasupra gurii. Numeroși pești au grupuri de tuberculi situați sub mandibulă; cei situați cel mai aproape de gură apar în general într-o singură pereche, în timp ce setul situat mai ventral se poate compune din până la patru tuberculi. Numărul efectiv de tuberculi este rareori mai mare de 30 (interval 18-28; Jensen *et al.* 2001). Tuberculii predominanți (din punct de vedere al numărului) sunt prezenți sub forma unei structuri singulare, relativ rotunde, cu înălțimea aproximativ echivalentă cu raza. Cei mai mulți masculi activi din punct de vedere reproductiv au, de asemenea, cel puțin câțiva tuberculi măriți și pronunțați astfel încât nu pot fi distinși ca structuri individuale.

Unele tipuri de substanțe chimice cu efect la nivel endocrin pot cauza apariția anormală a unor caracteristici sexuale secundare la sexul opus; de exemplu, agoniști ai receptorilor androgenici, cum ar fi 17 α -metiltestosteronul sau 17 β -trenbolonul, pot cauza apariția de tuberculi nupțiali la femelele de *Pimephales promelas* (Smith 1974; Ankley *et al.* 2001; 2003), în timp ce agoniști ai receptorilor estrogenici pot reduce numărul sau dimensiunea tuberculilor nupțiali la masculi (Miles-Richardson *et al.* 1999; Harries *et al.* 2000).

În continuare, este prezentată o descriere a caracterizării tuberculilor nupțiali la *Pimephales promelas* pe baza procedurilor utilizate în cadrul laboratorului Agenției de Protecție a Mediului din SUA din Duluth, Minnesota. Produsele și/sau echipamentele specifice pot fi înlocuite cu materiale comparabile aflate la dispoziție.

Vizualizarea se realizează cel mai bine cu ajutorul unei lupe iluminate sau al unui microscop de disecție 3X iluminat. Peștele este observat din partea dorsală și cu partea anterioară înainte (capul spre observator).

- Se așază peștele într-o placă Petri mică (de exemplu, cu diametrul de 100 mm), cu partea anterioară înainte și cu partea ventrală în jos. Se reglează vizorul pentru a putea identifica tuberculii. Se rulează peștele ușor și încet de pe o parte pe alta pentru a identifica zonele cu tuberculi. Se numără și se clasifică tuberculii.
- Se repetă observația pe partea ventrală a capului după ce s-a așezat peștele în placa Petri cu partea dorsală anterioară înainte.
- Observațiile nu trebuie să dureze mai mult de 2 minute pentru fiecare pește.

Numărarea și clasificarea tuberculilor

Au fost identificate șase zone specifice pentru evaluarea prezenței și a dezvoltării de tuberculi la adulții de *Pimephales promelas*. A fost creat un model pentru a cartografia localizarea și cantitatea tuberculilor prezenți (a se vedea partea de încheiere a prezentului apendice). Numărul tuberculilor este înregistrat, iar dimensiunea lor poate fi clasificată cantitativ astfel: 0-absent, 1-prezent, 2-mărit și 3-pronunțat pentru fiecare organism (Fig. 1).

Categoria 0 – absența oricărui tubercul. Categoria 1 – tubercul prezent, identificat ca orice tubercul care are un singur punct a cărui înălțime este aproape echivalentă cu raza sa. Categoria 2 – tubercul mărit, identificat prin țesutul sub formă de asterisc, prezentând în mod obișnuit o bază radială mare cu șanțuri sau caneluri care pornesc din centru. Înălțimea tuberculului este adesea mai neregulată, însă uneori poate fi rotunjită. Categoria 3 – tubercul pronunțat, de regulă foarte mare și rotunjit cu o structură mai puțin definită. Uneori, acești tuberculi se grupează formând o singură masă de-a lungul unei zone sau a mai multor zone (B, C și D, descrise mai jos). Colorația și forma sunt similare celor din categoria 2, însă uneori sunt destul de greu de distins. Utilizarea acestui sistem de clasificare va conduce în general la un număr total de tuberculi < 50 la un mascul normal din grupul de control care posedă un număr de tuberculi cuprins între 18 și 20 (Jensen *et al.* 2001).

Figura 1



Numărul efectiv de tuberculi la unii pești poate fi mai mare decât cel indicat în casetele model pentru o anumită zonă de clasificare. În acest caz, cifrele suplimentare pot fi marcate în interior, la dreapta sau la stânga casetei. Prin urmare, nu este necesar ca modelul să afișeze o simetrie. O altă tehnică pentru cartografierea tuberculilor perechi sau grupați vertical de-a lungul planului orizontal al gurii ar putea consta în dubla marcarea a două puncte de clasificare a tuberculilor într-o singură casetă.

Zonele cartografiate:

A — Tuberculii situați în jurul ochilor. Localizați dorsal spre ventral în jurul marginii anterioare a ochilor. De regulă multipli la masculii maturi din grupul de control, absenți la femelele din grupul de control, dispuși în general în perechi (câte unul lângă fiecare ochi) sau singuri la femelele expuse la androgeni.

B-Tuberculii situați între nări (porii canalelor senzoriale). De regulă dispuși în perechi la masculii din grupul de control la niveluri de dezvoltare mai mari (2- mărit sau 3- pronunțat). Absenți la femelele din grupul de control, însă uneori prezenți și dezvoltați la femelele expuse la androgeni.

C — Tuberculii situați imediat anterior nărilor, paralel cu gura. În general măriți sau pronunțați la masculii de control maturi. Prezenți sau măriți la masculii mai puțin dezvoltați sau la femelele tratate cu androgeni.

D – Tuberculi situați paralel de-a lungul liniei gurii. În general clasificați ca dezvoltați la masculii din grupul de control. Absenți la femelele din grupul de control, însă prezenți la femelele expuse la androgeni.

E – Tuberculii situați pe mandibulă, aproape de gură, de obicei de mici dimensiuni și în general dispuși în perechi. Variabili la masculii din grupul de control sau la cei tratați și la femelele tratate.

F – Tuberculii situați ventral față de E. De regulă de mici dimensiuni și dispuși în perechi. Prezenți la masculii din grupul de control și la femelele expuse la androgeni.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Chem Toxicol* 20: 1276-1290.
- (2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17- β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.
- (3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 34:3003-3011.

- (4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.
- (5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.
- (6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 47:129-145.
- (7) Smith RJF. 1974. Effects of 17 α -methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can J Zool* 52:1031-1038.

Model de tuberculi:

ID _____

Dată _____

Scor Total _____

Clasificare numerică

1-prezent

2-mărit

3-pronunțat

	O	X 1	X 1	X 1	X 1
--	---	-----	-----	-----	-----

	B	X 1	X 1	X 1	X 1
--	---	-----	-----	-----	-----

	C	X 1	X 1	X 1	X 1	X 1	X 1	X 1	X 1	X 1	X 1
	D	X 1	X 1	X 1	X 1	X 1	X 1	X 1	X 1	X 1	X 1

		E	X 1	X 1	
	F	X 1	X 1	X 1	X 1

Apendicele 5B

**EVALUAREA CARACTERISTICILOR SEXUALE SECUNDARE LA ORYZIAS LATIPES PENTRU
DETECTAREA ANUMITOR SUBSTANȚE CHIMICE CARE ACȚIONEAZĂ LA NIVEL ENDOCRIN**

Mai jos este prezentată o descriere a măsurării proceselor papilare (*), care sunt caracteristici sexuale secundare la *Oryzias latipes*.

- (1) După excizia ficatului (apendicele 6), carcasa este așezată într-un tub conic care conține aproximativ 10 ml de formol neutru 10 % tamponat (cu capul în sus și cu coada în jos). În cazul în care gonada este fixată într-o altă soluție decât formol neutru 10 % tamponat, se realizează cu ajutorul unei lame tăietoare o incizie transversală în carcasă între regiunea anterioară a înotătoarei anale și anus, având grijă să nu se lezeze gonoporul și gonada însăși (Figura 3) Se introduce capul peștelui în soluția fixatoare pentru a conserva gonadele, iar coada peștelui în formol neutru tamponat 10 % conform descrierii de mai sus.
- (2) După ce se introduce corpul peștelui în formol neutru tamponat 10 %, se prinde regiunea anterioară a înotătoarei anale cu ajutorul unei pensete și se pliază timp de 30 de secunde pentru a menține deschisă înotătoarea anală. Prințând înotătoarea anală cu ajutorul unei pensete, se prind câteva nervuri ale înotătoarei din regiunea anterioară cu grijă să nu se zgârie procesele papilare.
- (3) După menținerea deschisă a înotătoarei anale timp de aproximativ 30 de secunde, se introduce corpul peștelui în formol neutru 10 % tamponat la temperatura camerei și se lasă astfel până la măsurarea proceselor papilare (măsurarea trebuie efectuată după fixare timp de cel puțin 24 de ore).

Măsurare

- (1) După fixarea corpului peștelui în formol neutru 10 % tamponat timp de cel puțin 24 de ore, se scoate carcasa peștelui din tubul conic și se șterge formolul cu hârtie de filtru (sau un șervet de hârtie).
- (2) Se așează peștele cu abdomenul în sus. Se taie apoi cu grijă înotătoarea anală cu ajutorul unei foarfeci mici de disecție (este de preferat să se taie înotătoarea anală cu puțin pterigiofor).
- (3) Se prinde cu ajutorul unei pensete zona anterioară a înotătoarei anale excizate și se așază pe o lamelă din sticlă cu câteva picături de apă. Se acoperă apoi înotătoarea anală cu o altă lamelă din sticlă. Se procedează cu grijă pentru a nu zgâria procesele papilare în momentul prinderii înotătoarei anale cu penseta.
- (4) Se determină numărul de plăci comune care prezintă procese papilare cu ajutorul unui contor sub un microscop biologic (microscop drept sau microscop inversat). Procesele papilare sunt recunoscute atunci când o mică formațiune de procese este vizibilă pe marginea posterioară a plăcii comune. Se notează pe foaia de lucru numărul de plăci comune care prezintă procese papilare pentru fiecare nervură a înotătoarei (de exemplu, prima nervură: 0, a doua nervură: 10, a treia nervură: 12 etc.) și se notează suma acestor numere în foaia Excel pentru fiecare pește în parte. Dacă este necesar, se fotografiază înotătoarea anală și se determină pe fotografie numărul de plăci comune care prezintă procese papilare.
- (5) După măsurare, se introduce înotătoarea anală în tubul conic descris la punctul (1) și se depozitează.

(*) Procesele papilare apar în mod normal numai la masculii adulți și sunt situate pe nervurile înotătoarei, pornind de la cea de a doua până la cea de a șaptea sau a opta de la extremitatea posterioară a înotătoarei anale (Figurile 1 și 2). Cu toate acestea, procesele papilare apar rareori pe prima nervură de la extremitatea posterioară a înotătoarei anale. Această procedură de operare standard (POS) cuprinde măsurarea proceselor de pe prima nervură a înotătoarei (numărul nervurilor este calculat în cadrul acestei POS pornind de la extremitatea posterioară a înotătoarei anale)

Figura 1

Diagramă care ilustrează diferența de formă și de dimensiune a înotătoarei anale între sexe. A, mascul; B, femelă. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

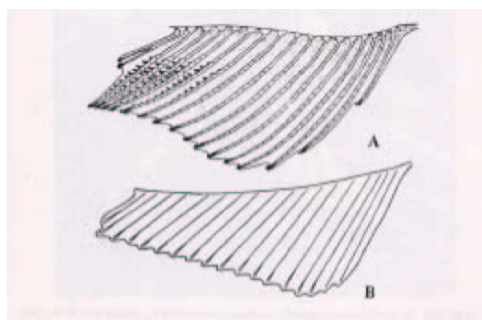


Figura 2

A, Procese papilare pe plăcile comune ale înotătoarei anale. J.P., placă comună; A.S., spațiu axial; P., proces. B, Extremitatea distală a radiei. Actinotrichiile (Act.) sunt situate la vârf. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

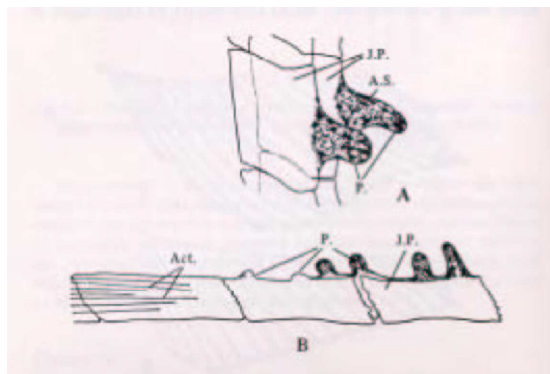
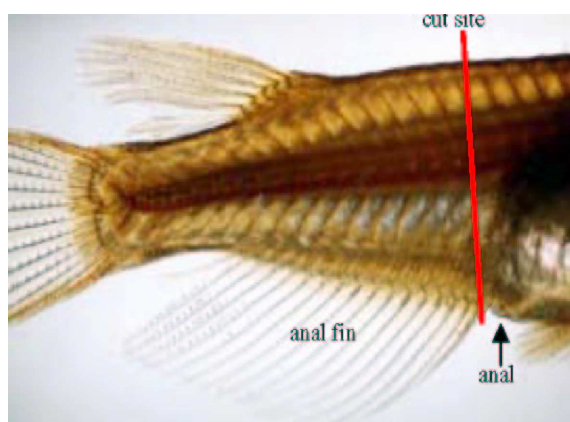


Figura 3

Fotografia unui corp de pește care ilustrează locul inciziei atunci când gonada este fixată într-o altă soluție de fixare decât formol neutru 10 % tamponat. În acest caz, corpul restant va fi tăiat între zona anterioară a înotătoarei anale și anus cu ajutorul unei lame (linia roșie), iar capul peștelui va fi introdus în soluția de fixare pentru gonade și partea corpului dinspre coadă va fi introdusă în formol neutru 10 % tamponat.



Apendicele 6

PROCEDURI RECOMANDATE DE PRELEVARE A PROBELOR PENTRU ANALIZA VITELOGENINEI

Se procedează cu grijă pentru a evita contaminarea încrucișată între probele VTG ale masculilor și femelelor.

Procedura 1A: *Pimephales promelas*, prelevare de sânge din vena/artera caudală

După anestezie, pedunculul caudal este parțial secționat cu o lamă de bisturiu și se recoltează sânge din vena/artera caudală cu un tub capilar heparinizat microhematocrit. După prelevarea sângelui, plasma este separată rapid prin centrifugare timp de 3 minute la 15 000 g (sau, alternativ, timp de 10 minute la 15 000 g la o temperatură de 4 °C). Dacă se dorește, procentul de hematocrit poate fi determinat în urma centrifugării. Plasma este extrasă apoi din tubul microhematocrit și depozitată într-un tub de centrifugare cu 0,13 unități de aprotinină (un inhibitor de protează) la -80°C până va fi posibilă determinarea vitelogeninei. În funcție de dimensiunea peștilor *Pimephales promelas* (care depinde de sex), volumele de plasmă care pot fi prelevate sunt cuprinse între 5 și 60 microlitri pentru fiecare pește (Jensen *et al.* 2001).

Procedura 1B: *Pimephales promelas*, prelevare de sânge din inimă

Alternativ, sângele poate fi prelevat printr-o puncție cardiacă realizată cu ajutorul unei seringi heparinizate (1 000 de unități de heparină/ml). Sângele este transferat în tuburi Eppendorf (ținute pe gheață) și apoi centrifugat (5 minute, 7 000 g, la temperatura camerei). Plasma trebuie transferată în tuburi Eppendorf curate (în alicote, dacă volumul de plasmă permite acest lucru) și congelată rapid la -80 °C până ce este analizată (Panter *et al.*, 1998).

Procedura 2A: *Oryzias latipes*, excizia ficatului

Extragerea peștilor de testare din camera de testare

- (1) Peștii pentru testare trebuie extrași din camera de testare cu ajutorul unui minciog de mici dimensiuni. Se procedează cu grijă pentru a nu scăpa peștii de testare în alte camere de testare.
- (2) În principiu, peștii de testare trebuie scoși în următoarea ordine: din vasul de control, vasul de control cu solvent (dacă este cazul), vasul cu cea mai mică concentrație, vasul cu concentrația medie, vasul cu cea mai mare concentrație și vasul de control pozitiv. În plus, trebuie extrași toți peștii masculi dintr-o cameră de testare înainte de extragerea femelelor rămase.
- (3) Sexul fiecărui pește pentru testare este identificat pe baza caracteristicilor sexuale secundare externe (de exemplu, forma înotătoarei anale).
- (4) Se așază peștii pentru testare într-un container de transport și se transportă la stația de lucru pentru excizia ficatului. Se verifică etichetele camerei de testare și containerul de transport pentru precizie și pentru a confirma faptul că numărul peștilor scoși din camera de testare și numărul peștilor rămași în camera de testare sunt conforme celor preconizate.
- (5) În cazul în care sexul nu poate fi stabilit pe baza aspectului exterior al peștelui, se îndepărtează toți peștii din incinta experimentală. În acest caz, sexul este identificat prin observarea gonadei sau a caracteristicilor sexuale secundare cu ajutorul unui microscop stereoscopic.

Excizia ficatului

- (1) Se transferă peștii pentru testare din containerul de transport în soluția anestezică cu ajutorul unui minciog de mici dimensiuni.
- (2) După anestezia peștilor pentru testare, aceștia sunt transferați pe o hârtie de filtru (sau pe un șervet de hârtie) cu ajutorul unei pensete (obișnuite). La prinderea peștilor pentru testare, se aplică brațele pensetei de o parte și de alta a capului pentru a evita ruperea cozii.
- (3) Se șterge apa de pe suprafața peștilor pentru testare cu o hârtie de filtru (sau cu un șervet de hârtie).

- (4) Se aşază peştele cu abdomenul în sus. Se efectuează apoi o mică incizie transversală între zona ventrală a gâtului şi zona de mijloc a abdomenului cu ajutorul unei foarfeci de disecţie.
- (5) Se introduce foarfeca de disecţie în mica incizie şi se efectuează o incizie de-a lungul liniei mediane a abdomenului, de la un punct caudal la mantaua branhială până la partea craniană a anusului. Se procedează cu grijă pentru a nu introduce foarfeca de disecţie prea adânc evitându-se astfel distrugerea ficatului şi a gonadei.
- (6) Se efectuează următoarele operaţiuni la un microscop stereoscopic.
- (7) Se aşază peştele pentru testare cu abdomenul în sus pe un şervet de hârtie (se află la dispoziţie, de asemenea, o placă Petri din sticlă sau o lamelă din sticlă).
- (8) Se îndepărtează pereţii cavităţii abdominale cu ajutorul unei pensete de precizie şi se exteriorizează organele interne. Dacă este necesar, organele interne pot fi exteriorizate, de asemenea, prin înlăturarea unei părţi a peretelui cavităţii abdominale.
- (9) Se expune porţiunea care leagă ficatul de vezica biliară cu ajutorul unei alte pensete de precizie. Se prinde apoi canalul biliar şi se excizează vezicula biliară. Se procedează cu grijă pentru a nu leza vezicula biliară.
- (10) Se prinde esofagul şi se separă prin excizare tractul gastrointestinal de ficat în acelaşi mod. Se procedează cu grijă pentru a nu vărsa conţinutul tractului gastrointestinal. Se separă prin excizare tractul gastrointestinal caudal de anus şi se îndepărtează tractul din cavitatea abdominală.
- (11) Se taie masa de grăsime şi alte ţesuturi de la periferia ficatului. Se procedează cu grijă pentru a nu zgâria ficatul.
- (12) Se prinde zona portală hepatică cu ajutorul pensetei de precizie şi se extrage ficatul din cavitatea abdominală.
- (13) Se aşază ficatul pe o lamelă din sticlă. Cu ajutorul pensetei de precizie, se îndepărtează grăsimea şi alte ţesuturi (de exemplu, mucoasă abdominală), dacă este necesar, de pe suprafaţa ficatului.
- (14) Se cântăreşte ficatul cu ajutorul unei balanţe analitice electronice, utilizând ca şi contragreutate un microtub de 1,5 ml. Se înregistrează valoarea pe fişa de lucru (citire: 0,1 mg). Se confirmă informaţiile de identificare pe eticheta microtubului.
- (15) Se închide capacul microtubului care conţine ficatul. Se depozitează într-un stativ pentru răcire (sau stativ cu gheaţă).
- (16) După excizia unui ficat, se curăţă instrumentele de disecţie sau se înlocuiesc cu unele curate.
- (17) Se excizează ficiaţi de la toţi peştii din containerul de transport conform descrierii de mai sus.
- (18) După excizarea ficiaţilor de la toţi peştii din containerul de transport (şi anume, toţi masculii sau toate femelele dintr-o cameră de testare), se aşază toate eşantioanele de ficat pe un stativ pentru tuburi prevăzut cu o etichetă de identificare şi se depozitează într-un congelator. Atunci când ficiaţi sunt donaţi pentru pretratament la scurt timp după excizie, eşantioanele sunt transportate la staţia de lucru următoare într-un stativ pentru răcire (sau stativ cu gheaţă).

După excizia ficatului, carcasa peştelui este disponibilă pentru histologia gonadelor şi măsurarea caracteristicilor sexuale secundare.

Model

Se depozitează eşantioanele de ficat prelevate de la peştii de testare la $\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$ în cazul în care nu sunt utilizate pentru pretratament imediat după excizie.

Figura 1

Se efectuează o incizie în partea anterioară a înotătoarelor pectorale cu ajutorul unei foarfeci.

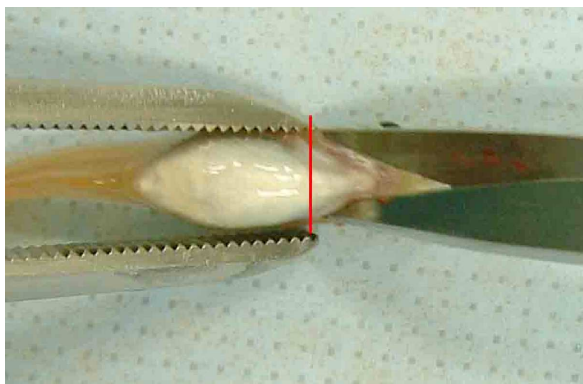


Figura 2

Se efectuează o incizie pe linia mediană a abdomenului cu ajutorul unei foarfeci spre un punct situat la aproximativ 2 mm cranial față de anus.

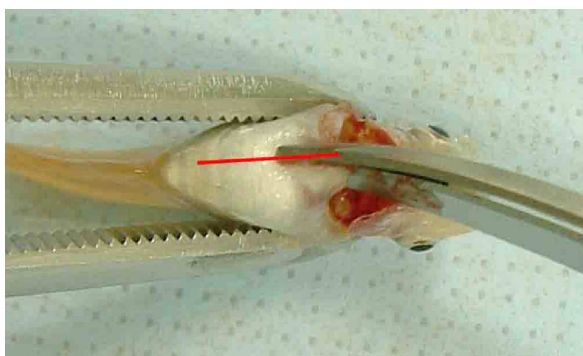


Figura 3

Pereții abdominali sunt îndepărtați cu ajutorul unui forceps pentru a expune ficatul și celelalte organe interne.

(Alternativ, pereții abdominali pot fi fixați lateral cu ace).

Săgețile indică ficatul.

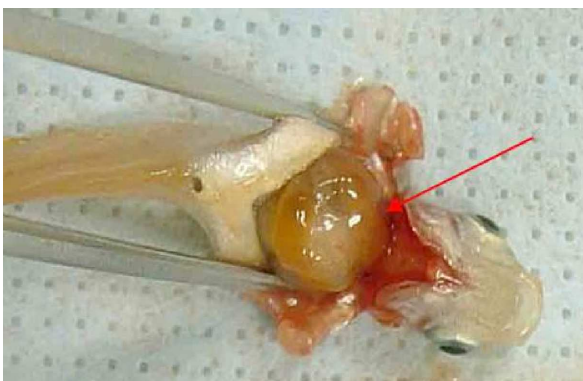
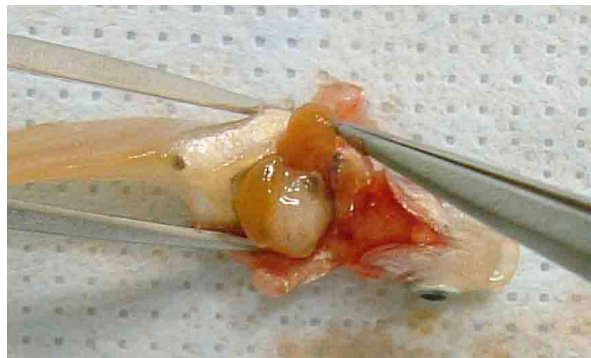
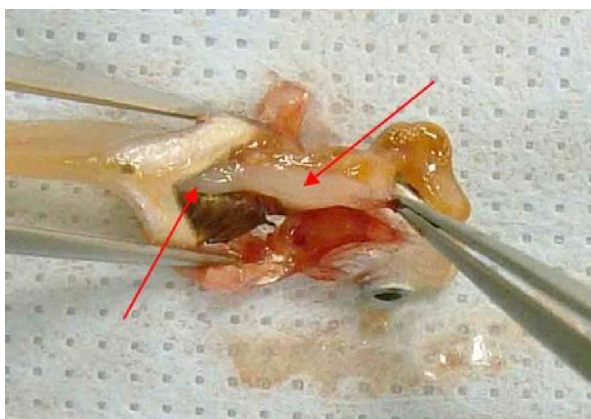


Figura 4

Ficatul este disecat și excizat cu ajutorul unui forceps.

*Figura 5*

Intestinele sunt retrase ușor cu ajutorul unui forceps.

*Figura 6*

Ambele capetele ale intestinelor și toate elementele mezenterice atașate sunt secționare cu ajutorul unei foarfeci.

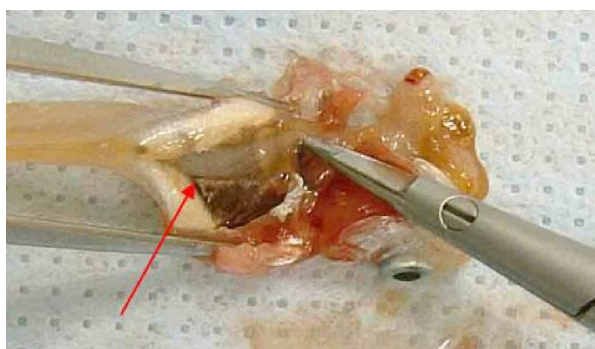


Figura 7 (femelă)

Procedura este identică în cazul femelei.

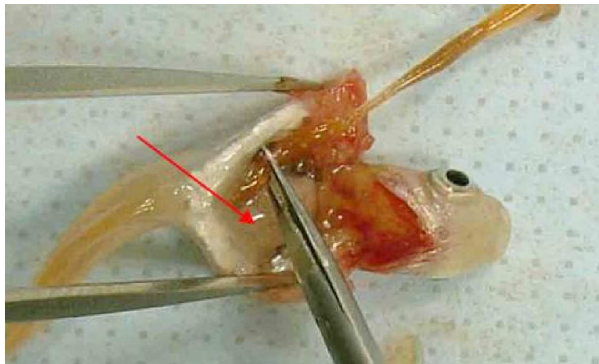


Figura 8

Procedură încheiată.



Procedura 2 B: *Oryzias latipes*, pretratament al ficatului pentru analiza vitelogeninei

Se ia flaconul cu tamponul de omogenat din trusa ELISA și se răcește în bucăți cu gheață (temperatura soluției: $\leq 4^{\circ}\text{C}$). În cazul în care se utilizează un tampon de omogenat din sistemul EnBio ELISA, se decongelează soluția până ajunge la temperatura camerei și apoi se răcește flaconul în bucăți de gheață.

Se calculează volumul tamponului de omogenat pentru ficat pe baza greutății sale (se adaugă 50 μl de tampon de omogenat per mg de ficat). De exemplu, în cazul în care greutatea ficatului este de 4,5 mg, volumul tamponului de omogenat pentru ficat este de 225 μl . Se întocmește o listă a volumelor de tampon de omogenat pentru toți ficații.

Se pregătește ficatul pentru pretratament.

- (1) Se scoate de la congelator microtubul de 1,5 ml care conține ficatul chiar înainte de pretratament.
- (2) Pretratamentul ficatului de la masculi trebuie realizat înaintea celui al femelelor pentru a evita contaminarea cu vitelogenină. În plus, pretratamentul pentru grupele de testare trebuie realizat în următoarea ordine: control, control cu solvent (dacă este cazul), cea mai mică concentrație, concentrație medie, cea mai mare concentrație și control pozitiv.

- (3) Numărul microtuburilor de 1,5 ml care conțin probe de ficat scoase din congelator la un moment dat nu trebuie să depășească numărul care poate fi centrifugat în acel moment.
- (4) Se aranjează microtuburile de 1,5 ml care conțin probe de ficat pe stativul cu gheață în ordinea numerotării eșantioanelor (nu este necesară decongelarea ficatului).

Efectuarea pretratămării

1) Adăugarea tamponului de omogenat

Se verifică lista pentru a se identifica volumul de tampon de omogenat care trebuie utilizat pentru o anumită probă de ficat și se ajustează micropipeta (intervalul de volume: 100-1 000 μ l) până la volumul adecvat. Se montează un vârf curat la micropipetă.

Se extrage tamponul de omogenat din flaconul cu reactiv și se adaugă tamponul în microtubul de 1,5 ml care conține ficatul.

Se adaugă tamponul de omogenat în toate microtuburile de 1,5 ml care conțin ficat conform procedurii descrise mai sus. Nu este necesară schimbarea vârfului micropipetei cu unul nou. Cu toate acestea, în cazul în care vârful este contaminat sau este suspectat a fi contaminat, acesta trebuie schimbat.

2) Omogenizarea ficatului

- Se atașează un nou pistil pentru omogenizare la omogenizatorul microtubului.
- Se introduce pistilul în microtubul de 1,5 ml. Se utilizează omogenizatorul microtubului pentru a presa ficatul între suprafața pistilului și peretele intern al microtubului de 1,5 ml.
- Se lasă omogenizatorul microtubului să funcționeze 10-20 de secunde. Se răcește microtubul de 1,5 ml cu ajutorul unor bucăți de gheață pe parcursul operațiunii.
- Se scoate pistilul din microtubul de 1,5 ml și se lasă deoparte aproximativ 10 secunde. Se efectuează apoi un control vizual al stării suspensiei.
- Dacă bucățile de ficat sunt observate în suspensie, se repetă operațiunile (3) și (4) pentru a pregăti în mod satisfăcător omogenatul de ficat.
- Se răcește omogenatul de ficat în suspensie pe stativul cu gheață până în momentul centrifugării.
- Se schimbă pistilul cu unul nou pentru fiecare omogenat.
- Se omogenizează toți ficii cu tampon de omogenat conform procedurii descrise mai sus.

3) Centrifugarea omogenatului de ficat în suspensie

- Se fixează temperatura camerei frigorifice de centrifugare la $\leq 5^{\circ}\text{C}$.
- Se introduc microtuburile de 1,5 ml care conțin omogenatul de ficat în suspensie în centrifuga frigorifică (se ajustează dacă este necesar).
- Se centrifughează omogenatul de ficat în suspensie la 13 000 g timp de 10 min la $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Cu toate acestea, dacă supernatantele sunt separate în mod adecvat, forța și timpul de centrifugare pot fi ajustate după necesități.
- După centrifugare, se verifică dacă supernatantele sunt separate în mod adecvat (suprafață: lipide, intermediar: supernatant, strat inferior: țesut hepatic). Dacă separarea nu este adecvată, se centrifughează suspensia din nou în aceleași condiții.
- Se elimină toate probele din centrifuga frigorifică și se aranjează în ordinea numerotării eșantioanelor pe stativul cu gheață. Se procedează cu atenție pentru a nu resuspenda fiecare strat separat după centrifugare.

4) Colectarea supernatantului

- Se așază patru microtuburi de 0,5 ml pentru depozitarea supernatantului în stativul pentru tuburi.
- Se colectează 30 μ l din fiecare supernatant (separat ca strat intermediar) cu micropipeta și se introduce într-un microtub de 0,5 ml. Se procedează cu atenție pentru a nu colecta lipide de pe suprafață sau țesutul hepatic din stratul inferior.
- Se colectează supernatantul și se introduce în celelalte două microtuburi de 0,5 ml în același mod ca cel descris mai sus.
- Se colectează restul supernatantului cu micropipeta (dacă este fezabil: $\geq 100 \mu$ l). Se introduce apoi supernatantul în microtubul de 0,5 ml rămas. Se procedează cu atenție pentru a nu colecta lipide de pe suprafață sau țesutul hepatic din stratul inferior.
- Se închide dopul microtubului de 0,5 ml și se notează volumul supernatantului pe etichetă. Apoi se răcesc imediat microtuburile pe stativul cu gheață.
- Se schimbă vârful micropipetei cu unul nou pentru fiecare supernatant. În cazul în care o cantitate mare de lipide se lipește de vârf, se schimbă imediat cu unul nou pentru a evita contaminarea extractului de ficat cu grăsime.
- Se repartizează întregul supernatant centrifugat în patru microtuburi de 0,5 ml în conformitate cu procedura descrisă mai sus.
- După distribuirea supernatantului în microtuburile de 0,5 ml, se pun pe stativul pentru tuburi cu eticheta de identificare și apoi se introduc imediat în congelator. În cazul în care concentrațiile de VTG sunt măsurate imediat după pre-tratament, un microtub de 0,5 ml (conținând 30 μ l de supernatant) se păstrează la rece în stativul pentru tuburi și se transferă în stația de lucru unde se realizează testul ELISA. În acest caz, se așază microtuburile rămase în stativele pentru tuburi și se introduc în congelator.
- După colectarea supernatantului, se elimină reziduurile în mod corespunzător.

Depozitarea eșantioanelor

Microtuburile de 0,5 ml conținând supernatantul omogenatului de ficat se depozitează la temperatura $\leq -70^\circ\text{C}$ până în momentul utilizării acestora în cadrul testului ELISA.

Procedura 3A: Peștele-zebră, prelevare de sânge din vena/artera caudală

Imediat după anestezie, se secționează transversal pedunculul caudal și se prelevează probe de sânge din artera/vena caudală cu ajutorul unui tub capilar microhematocrit heparinizat. Volumele de sânge variază de la 5 la 15 μ l în funcție de dimensiunile peștilor. Un volum egal de tampon de aprotinină (6 μ g/ml în PBS) se adaugă în tubul microcapilar, iar plasma este separată de sânge prin centrifugare (5 minute la 600 g). Plasma este colectată în tuburi de testare și depozitată la o temperatură de -20°C până în momentul analizei vitelogeninei sau a altor proteine care prezintă interes.

Procedura 3B: Peștele-zebră, prelevare de sânge prin puncție cardiacă

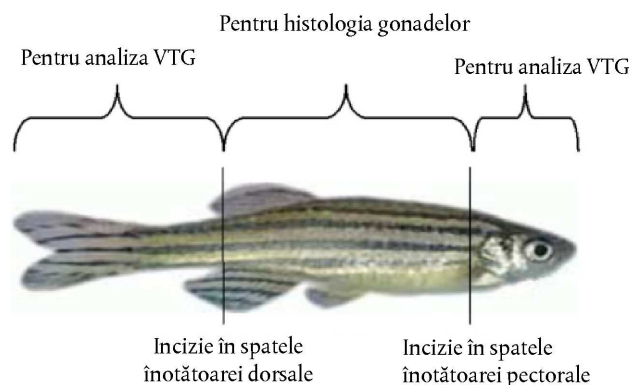
Pentru a evita coagularea sângelui și degradarea proteinelor, probele sunt colectate într-o soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) conținând heparină (1 000 unități/ml) și aprotinină — inhibitor de protează (2 TIU/ml). Ca ingrediente pentru tampon, se recomandă heparină, sare de amoniu și aprotinină liofilizată. Pentru prelevarea de probe de sânge se recomandă utilizarea unei seringi (1ml) cu un ac subțire fix (de exemplu, Braun Omnikan-F). Seringa trebuie umplută în prealabil cu tampon (aproximativ 100 de microlitri) pentru a realiza o evaluare completă a volumelor sanguine mici de la fiecare pește. Probele de sânge sunt prelevate prin puncție cardiacă. Peștele trebuie anesteziat în prealabil cu MS-222 (100 mg/l). Un plan de anestezie corespunzător este cel care permite utilizatorului să distingă bătăile inimii peștelui-zebră. În timpul efectuării puncției cardiace, aplicați o tensiune ușoară pe pistonul seringii. Volumul de sânge prelevat se încadrează variază între 20-40 microlitri. După efectuarea puncției cardiace, amestecul de sânge și soluție tamponată trebuie introdus într-un tub de testare. Plasma este separată de sânge prin centrifugare (20 de minute; 5 000 g) și trebuie depozitată la o temperatură de -80°C până în momentul efectuării analizei.

Procedura 3C: POS: Peștele-zebră, omogenizarea capului și a cozii

1. Peștii sunt aneșteziați și eutanasiați conform descrierii testului.
2. Capul și coada peștelui sunt tăiate conform figurii 1.

Important: Toate instrumentele de disecție, precum și planșa pentru efectuarea inciziilor trebuie clătite și curățate în mod corespunzător (de exemplu, cu etanol 96 %) între fiecare operațiune de manipulare a peștilor pentru a preveni „poluarea cu vitelogenină” de la femele sau de la masculii induși la masculii neinduși.

Figura 1



3. Greutatea materialului conținând cap și coadă de la fiecare pește este măsurată, rotunjindu-se greutatea la cea mai apropiată cifră întreagă în mg.
4. După cântărire, părțile sunt introduse în tuburi corespunzătoare (de exemplu, 1,5 ml Eppendorf) și congelate la o temperatură de -80°C până la omogenizare sau sunt direct omogenizate pe gheață cu ajutorul a două pistiluri din plastic. (Pot fi utilizate alte metode dacă sunt realizate pe gheață, iar rezultatul este o masă omogenă). Important: Tuburile trebuie numerotate în mod corect astfel încât capul și coada peștelui să poată fi corelate cu secțiunea de corp corespunzătoare utilizată pentru histologia gonadelor.
5. Atunci când se obține o masă omogenă, se adaugă un **tampon de omogenizare** (*) înghețat în greutate 4 x greutatea țesutului. Se continuă operațiunea cu ajutorul pistilurilor până ce amestecul devine omogen. Notă importantă: Se utilizează pistiluri noi pentru fiecare pește.
6. Probele se plasează pe gheață până la momentul centrifugării la 4°C la 50 000 g timp de 30 min.
7. Se utilizează o pipetă pentru a repartiza câte 20 μl de supernatant în **cel puțin două** tuburi introducând vârful pipetei sub stratul de grăsime de la suprafață și aspirând cu grijă supernatantul fără nicio fracțiune de grăsime sau de granule.
8. Tuburile sunt depozitate la -80°C până în momentul utilizării.

(*) Tamponul de omogenizare:

— [50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % amestec de inhibitori de protează (Sigma)]: 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 μl amestec de inhibitori de protează.

— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), de exemplu de la BIE & Berntsen, Danemarca.

— Amestec de inhibitori de protează: De la Sigma (pentru țesut de mamifer) Numărul produsului P 8340.

NOTĂ: Tamponul de omogenizare trebuie utilizat în ziua fabricării sale. Se așează pe gheață în timpul utilizării.

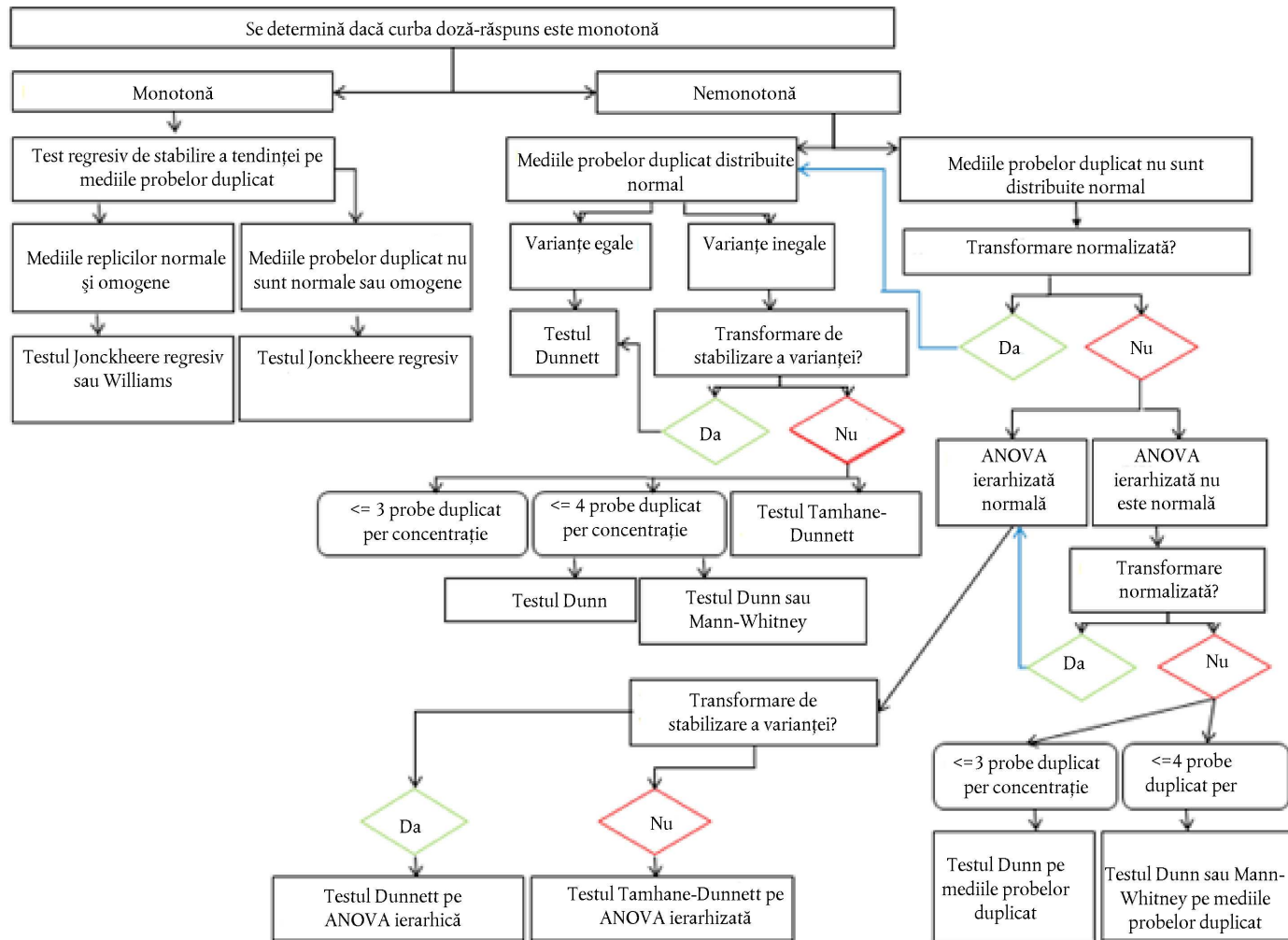
*Apedicele 7***PROBE FORTIFICATE DE VITELOGENINĂ ȘI STANDARDUL DE REFERINȚĂ INTERTEST**

De fiecare dată când sunt efectuate teste de măsurare a vitelogeninei, va fi analizată o probă fortificată obținută cu ajutorul unui standard de referință interteste Vitelogenina utilizată pentru prepararea standardului de referință interteste va proveni de la un lot diferit de cel utilizat pentru prepararea standardelor de calibrare pentru testul care urmează să fie realizat.

Proba fortificată va fi preparată prin adăugarea unei cantități cunoscute de standard interteste la o probă de plasmă de mascul de control Proba va fi fortificată pentru a obține o concentrație de vitelogenină între de 10 și de 100 de ori mai mare față de concentrația de vitelogenină preconizată pentru peștii masculi de control. Proba de plasmă de masculi de control care este fortificată poate proveni de la un singur pește sau poate fi un amestec de la mai mulți pești.

Un subeșantion de plasmă nefortificată de mascul de control va fi analizat în cel puțin două godeuri duplicat. Proba fortificată va fi analizată, de asemenea, în cel puțin două godeuri duplicat. Cantitatea medie de vitelogenină din cele două probe de plasmă nefortificate de mascul de control va fi adăugată la cantitatea calculată de vitelogenină adăugată la probele fortificate în vederea determinării concentrației preconizate. Raportul dintre respectiva concentrație preconizată și concentrația măsurată va fi raportat împreună cu rezultatele fiecărui set de teste efectuate în ziua respectivă.

DIAGRAMĂ DECIZIONALĂ PENTRU ANALIZA STATISTICĂ



C.49 Test de toxicitate acută pe embrioni de pește (Fish Embryo Acute Toxicity – FET)

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 236 (2013). Aceasta descrie un test de toxicitate acută pe embrioni de peștezebră (*Danio rerio*). Acest test este conceput pentru determinarea toxicității acute a substanțelor chimice asupra stadiilor embrionare ale peștilor. Testul FET se bazează pe studii și activități de validare efectuate asupra peștelui-zebră (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14). Testul FET a fost aplicat cu succes unei game largi de substanțe chimice care prezintă diferite moduri de acțiune și grade de volatilitate, solubilitate și hidrofobicitate (trecute în revistă în notele 15 și 16).
2. Definițiile utilizate în cadrul acestei metode de testare sunt prezentate în apendicele 1.

PRINCIPIUL TESTULUI

3. Ouăle de pește-zebră nou fertilizate sunt expuse unei substanțe chimice pentru o perioadă de 96 de ore. La fiecare 24 de ore, se înregistrează până la patru observații apicale drept indicatori de letalitate (6): (i) coagularea ouălor fertilizate, (ii) lipsa formării de somite, (iii) lipsa desprinderii mugurelui caudal de sacul vitelin și (iv) lipsa bătăilor inimii. La finalul perioadei de expunere, toxicitatea acută se determină pe baza unui rezultat pozitiv în oricare dintre cele patru observații apicale înregistrate și se calculează LC_{50} .

CONSIDERAȚII INIȚIALE

4. Informațiile utile privind proprietățile specifice substanței includ formula structurală, greutatea moleculară, puritatea, stabilitatea în apă și la lumină, pK_a și K_{ow} , solubilitatea în apă și presiunea vaporilor precum și rezultatele unui test de biodegradabilitate rapidă [MT C.4 (17) sau MT C.29 (18)]. Solubilitatea și presiunea vaporilor pot fi folosite pentru a calcula constanta legii lui Henry, care va arăta dacă se pot înregistra pierderi datorate evaporării substanței chimice de testare. Ar trebui să fie disponibilă o metodă analitică fiabilă de cuantificare a substanței în soluțiile de testare, a cărei precizie și ale cărei limite de detecție să fie cunoscute și raportate.
5. În cazul în care metoda de testare este utilizată pentru testarea unui amestec, compoziția acestuia trebuie să fie caracterizată, pe cât posibil, de exemplu prin identitatea chimică a constituenților săi, prezența lor cantitativă și proprietățile specifice substanței (a se vedea punctul 4). Înainte de utilizarea acestei metode de testare pentru testarea unui amestec în scopul reglementării, trebuie luat în considerare dacă aceasta va oferi rezultate acceptabile pentru procesul de reglementare.
6. În ceea ce privește substanțele care pot fi activate prin intermediul metabolismului, există dovezi conform cărora peștii-zebră au într-adevăr capacități de biotransformare (19)(20)(21)(22). Cu toate acestea, capacitatea metabolică a peștilor în stadiu embrionar nu este întotdeauna similară cu cea a peștilor alevini sau adulți. De exemplu, alcoolul alilic cu efect toxic (9) nu a fost inclus în testul FET. Prin urmare, în cazul în care există indicii că metaboliții sau alți produși de transformare relevanți pot fi mai toxici decât compusul părinte, se recomandă, de asemenea, efectuarea testului cu acești metaboliți/produși de transformare, precum și utilizarea rezultatelor la elaborarea concluziilor despre toxicitatea substanței chimice de testare sau, alternativ, se efectuează un alt test care ia în considerare, de asemenea, metabolismul.
7. În cazul substanțelor cu o greutate moleculară $\geq 3kDa$, cu o structură moleculară foarte voluminoasă și în cazul substanțelor care provoacă o eclozare întârziată care ar putea împiedica sau reduce expunerea după eclozare, nu se așteaptă ca embrionii să fie sensibili din cauza biodisponibilității limitate a substanței și se recomandă alte teste de toxicitate mai adecvate.

VALIDITATEA TESTULUI

8. Pentru ca rezultatele testului să fie valide, se aplică următoarele criterii:
 - a) Rata generală de fertilizare a ouălor colectate trebuie să fie $\geq 70\%$ în lotul testat.

- b) Temperatura apei trebuie să fie menținută la 26 ± 1 °C în camerele de testare în orice moment al testului.
- c) Supraviețuirea generală a embrionilor din controlul negativ (apă de diluție) și, după caz, din controlul solvent trebuie să fie ≥ 90 % până la sfârșitul perioadei de expunere de 96 de ore.
- d) Expunerea la controlul pozitiv (de exemplu, 4,0 mg/l 3,4 dichloroanilină pentru peștele-zebră) trebuie să aibă ca rezultat o mortalitate de cel puțin 30 % la sfârșitul perioadei de expunere de 96 de ore.
- e) Rata de eclozare în controlul negativ (și controlul cu solvent, dacă este cazul) trebuie să fie ≥ 80 % la sfârșitul expunerii de 96 de ore.
- f) La sfârșitul perioadei de expunere de 96 de ore, concentrația de oxigen dizolvat în controlul negativ și concentrația cea mai mare de testare trebuie să fie ≥ 80 % din saturație.

DESCRIEREA METODEI

9. O prezentare generală a condițiilor de întreținere și de testare recomandate este disponibilă în apendicele 2.

Aparatură

10. Următoarele echipamente sunt necesare:

- a) Bazine din material chimic inert (de exemplu sticlă) și cu o capacitate adecvată în raport cu încărcarea recomandată (a se vedea „Menținerea peștilor reproducători”, punctul 14).
- b) Microscop inversat și/sau binocular cu o capacitate de mărire de cel puțin 80 de ori. În cazul în care temperatura din încăperea utilizată pentru înregistrarea de observații nu poate fi ajustată la 26 ± 1 °C, este necesar un stadiu de mișcare încrucișată cu temperatură controlată sau utilizarea altor metode de menținere a temperaturii;
- c) Camere de testare; de exemplu, plăci standard cu 24 de godeuri cu o adâncime de aproximativ 20 mm. (a se vedea „Camere de testare”, punctul 11);
- d) de exemplu, folie autoadezivă pentru a acoperi plăcile cu 24 de godeuri;
- e) Incubator sau cameră climatizată cu temperatură controlată, care să permită menținerea unei temperaturi de 26 ± 1 °C în godeuri (sau în camerele de testare);
- f) pH-metru;
- g) Aparat pentru măsurarea oxigenului;
- h) Echipament pentru determinarea durității și conductivității apei;
- i) Captor de gameți: tăvi instrumentare din sticlă, oțel inoxidabil sau alte materiale inerte; plasă metalică (mărimea grilajului $2 \pm 0,5$ mm) din oțel inoxidabil sau alt material inert care să protejeze ouăle după ce sunt depuse; substrat de reproducere (de exemplu, imitații de plante din material inert) [MT C.48, apendicele 4a (23)];
- j) Pipete cu deschideri largite pentru a colecta ouă;
- k) Vase din sticlă pentru a pregăti diferite concentrații de testare și apa de diluție (pahare de laborator, flacoane gradate, cilindri gradați și pipete gradate) sau pentru a colecta ouă de la peștele-zebră (de exemplu, pahare de laborator, vase de cristalizare);
- l) În cazul în care pentru efectuarea testului sunt utilizate sisteme alternative de expunere, cum ar fi dozarea dinamică (24) sau pasivă (25), sunt necesare facilități și echipamente adecvate.

Camere de testare

11. Se utilizează camere de testare din sticlă sau polistiren (de exemplu, plăci cu 24 de godeuri, cu o capacitate de umplere de 2,5-5 µl per godeu). În cazul în care se suspectează adsorbția la polistiren (de exemplu, pentru substanțe plane, nepolare cu K_{ow} ridicat), se vor folosi materiale inerte (sticlă) pentru a reduce pierderile datorate adsorbției (26). Camerele de testare trebuie să fie poziționate aleatoriu în incubator.

Apa și condițiile de testare

12. Diluarea apei de întreținere se recomandă în vederea obținerii unor niveluri de duritate tipice pentru mai multe tipuri de apă de suprafață. Apa de diluție trebuie să fie preparată din apă reconstituită (27). Gradul de duritate rezultat trebuie să fie echivalent cu 100-300 mg/l $CaCO_3$ pentru a preveni precipitarea excesivă a carbonatului de calciu. Poate fi utilizată, de asemenea, apă de fântână sau un alt tip de apă cu caracteristici similare. Apa reconstituită poate fi adaptată în apă de întreținere cu duritate scăzută prin diluarea cu apă deionizată până la un raport de 1:5 până la o duritate minimă de 30-35 mg/l $CaCO_3$. Apa se aerează la saturația oxigenului înaintea adăugării substanței chimice de testare. Temperatura trebuie menținută la $26 \pm 1^\circ C$, în toate godeurile, pe întreaga durată a testului. Valoarea pH-ului trebuie să se situeze între 6,5 și 8,5 și să nu varieze cu mai mult de 1,5 unități pe parcursul testului. Dacă nu se estimează că pH-ul va rămâne în acest interval, ajustarea pH-ului trebuie realizată înainte de începutul testului. Se recomandă ca reglarea pH-ului să se efectueze astfel încât concentrația soluției stoc să nu fie schimbată semnificativ și să nu apară nicio reacție chimică sau precipitare a substanței chimice de testare. Se recomandă utilizarea de hidrogen clorurat (HCl) și hidroxid de sodiu (NaOH) pentru corectarea pH-ului în soluțiile care conțin substanța chimică de testare.

Soluții de testare

13. Soluțiile de testare a concentrațiilor selectate pot fi preparate, de exemplu, prin diluarea unei soluții stoc. Soluțiile stoc se prepară de preferință prin simpla amestecare sau agitare a substanței chimice de testare în apa de diluție prin mijloace mecanice (de exemplu, agitare și/sau ultrasunete). În cazul în care substanța chimică de testare este greu de dizolvat în apă, se vor respecta procedurile descrise în Documentul de orientare al OCDE nr. 23 privind manipularea substanțelor și amestecurilor dificile (28). Utilizarea solvenților trebuie evitată, dar aceștia pot fi necesari în anumite situații pentru a produce o soluție stoc cu o concentrație corespunzătoare. În cazul în care se utilizează un solvent pentru a contribui la prepararea soluției stoc, concentrația sa finală nu trebuie să depășească 100 µl/l și trebuie să fie aceeași în toate vasele de testare. Dacă se utilizează un solvent, este necesar un grup de control suplimentar cu solvent.

Întreținerea peștilor reproducători

14. Pentru producția de ouă, se folosește un efectiv de reproducere de pești-zebră neexpuși de tip sălbatic, cu o rată de fertilizare a ouălor bine documentată. Peștii nu trebuie să prezinte simptome de infecție și de boală sesizabile din punct de vedere macroscopic și nu trebuie să fi fost supuși unui tratament medicamentos (pentru afecțiuni acute sau profilactic) timp de 2 luni înainte de eliberarea gameților. Peștii reproducători sunt ținuti în acvarii cu o capacitate de încărcare recomandată de 1 l de apă per pește și o perioadă fixă de expunere la lumină de 12-16 ore (29)(30)(31)(32)(33). Ratele optime de filtrare trebuie ajustate; se vor evita ratele de filtrare excesive care determină perturbarea masivă a apei. Pentru condițiile de hrănire, a se vedea apendicele 2. Surplusul de hrană trebuie evitat, iar calitatea apei și curățenia acvariilor trebuie monitorizate regulat și readuse la starea inițială, dacă este necesar.

Testarea competenței

15. Ca substanță de referință, 3,4-dicloranilina [utilizată în studiile de validare (1)(2)] trebuie testată într-un interval complet concentrație-răspuns pentru a verifica sensibilitatea sușei de pește utilizată, de preferință de două ori pe an. Pentru orice laborator care stabilește inițial această determinare, se va folosi substanța chimică de referință. Un laborator poate utiliza această substanță chimică pentru a-și demonstra competența tehnică în ceea ce privește efectuarea determinării înainte de transmiterea datelor în scopuri de reglementare.

Producția de ouă

16. Ouăle de pește-zebră pot fi produse prin grupurile de eliberare a gameților (în acvarii individuale de eliberare a gameților) sau prin eliberarea de gameți în masă (în bazine de întreținere). În cazul grupurilor de eliberare a gameților, masculii și femelele (de exemplu, într-un raport de 2:1) dintr-un grup de reproducere sunt plasați în bazine de eliberare a gameților cu câteva ore înainte de apusul soarelui, în ziua anterioară testului. Întrucât grupurile de pești-zebră de eliberare a gameților ar putea ocazional să nu poată elibera gameți, este recomandată utilizarea în paralel a cel puțin trei acvarii de eliberare a gameților. Pentru a evita influențele genetice, ouăle sunt colectate de la cel puțin trei grupuri de reproducere, amestecate și selectate în mod aleatoriu.
17. Pentru colectarea ouălor, se plasează captoare de gameți în bazinele de eliberare a gameților sau în bazinele de întreținere înainte de apusul soarelui în ziua anterioară testului sau înainte de răsăritul soarelui în ziua testului. Pentru a preveni prădarea ouălor de către peștii-zebră adulți, captoarele de gameți sunt acoperite cu plasă metalică inertă cu o dimensiune adecvată a ochiurilor (aproximativ $2 \pm 0,5$ mm). Dacă se consideră că este necesar, de plasa metalică se fixează plante artificiale din materiale inerte (de exemplu, plastic sau sticlă) ca stimuli pentru eliberarea de gameți (3)(4)(5)(23)(35). Trebuie folosite materiale din plastic alterat care nu dezinfectează (de exemplu, ftalați). Împerecherea, eliberarea de gameți și fertilizarea au loc în primele 30 de minute după răsăritul soarelui, iar captoarele de gameți cu ouăle colectate pot fi îndepărtate cu grijă. Se recomandă clătirea ouălor cu apă reconstituită după colectarea acestora din captoare.

Diferențierea ouălor

18. La 26 °C, ouăle fertilizate sunt supuse primei divizări după aproximativ 15 minute, iar divizările consecutive sincrone formează 4, 8, 16 și 32 de blastomere (a se vedea appendicele 3) (35). În aceste etape, ouăle fertilizate pot fi identificate în mod clar prin dezvoltarea unei blastule.

PROCEDURA

Condiții de expunere

19. Douăzeci de embrioni per concentrație (un embrion per godeu) sunt expuși substanței chimice de testare. Expunerea trebuie să fie de așa natură încât ± 20 % din concentrația chimică nominală să se mențină pe toată durata testului. Dacă acest lucru nu este posibil într-un sistem static, se va aplica un interval de reînnoire semistatic flexibil (de exemplu, reînnoire la fiecare 24 de ore). În aceste cazuri, concentrațiile de expunere trebuie să fie verificate ca un minim în concentrația cea mai mare și cea mai scăzută la începutul și la sfârșitul fiecărui interval de expunere (a se vedea punctul 36). Dacă nu se poate menține o concentrație de expunere de ± 20 % din concentrațiile nominale, toate concentrațiile trebuie măsurate la începutul și la sfârșitul fiecărui interval de expunere (a se vedea punctul 36). În momentul reînnoirii, trebuie avut grijă ca embrionii să rămână acoperiți de o cantitate mică din vechile soluții de testare pentru a preveni uscarea lor. Conceptul de testare poate fi adaptat astfel încât să îndeplinească cerințele de testare ale substanțelor respective (de exemplu, sisteme de dozare în regim dinamic (24) sau pasive (25) pentru substanțe ușor degradabile sau cu o capacitate mare de adsorbție (29), sau altele pentru substanțe volatile (36)(37)). În orice caz, trebuie luate măsuri pentru a reduce la minimum orice tip de stres asupra embrionilor. Camerele de testare trebuie să fie condiționate timp de cel puțin 24 de ore cu soluțiile de testare înainte de începerea testului. Condițiile de testare sunt prezentate pe scurt în appendicele 2.

Concentrațiile de testare

20. În mod normal, sunt necesare cinci concentrații ale substanței chimice de testare, spațiate de un factor constant care nu depășește 2,2 pentru a îndeplini cerințele statistice. În cazul în care se utilizează mai puțin de cinci concentrații, se va prezenta justificarea alegerii. Cele mai mari concentrații de testare trebuie să aibă, de preferință, drept rezultat o letalitate de 100 %, iar cea mai scăzută concentrație de testare trebuie de preferință să nu producă niciun efect observabil, astfel cum este definit la punctul 28. Un test de stabilire a intervalului înainte de testul definitiv permite selectarea unui interval adecvat de concentrații. Stabilirea intervalului se efectuează în mod obișnuit folosind zece embrioni per concentrație. Următoarele instrucțiuni se referă la efectuarea testului pe plăci cu 24 de godeuri. În cazul în care se folosesc camere de testare diverse (de exemplu, vase mici Petri) sau se testează mai multe concentrații, instrucțiunile trebuie ajustate corespunzător.

21. Detalii și instrucțiuni vizuale pentru alocarea concentrațiilor pe plăcile cu 24 de godeuri sunt disponibile la punctul 27 și în apendicele 4 figura 1.

Controale

22. Sunt necesare controale cu apă de diluție în calitate de control negativ și plăci de control intern. Dacă se observă mai mult de 1 embrion mort în placa de control intern, placa este respinsă, reducând astfel numărul de concentrații utilizate pentru a deriva LC_{50} . În cazul în care se respinge o placă întreagă, capacitatea de a evalua și de a distinge efectele observate ar putea să fie îngreunată, în special în cazul în care placa respinsă este cea de control cu solvent sau o placă în care embrionii tratați sunt de asemenea afectați. În primul caz, testul trebuie repetat. În cel de al doilea caz, pierderea unui grup/mai multor grupuri supus(e) tratamentului datorită mortalității controlului intern poate să limiteze abilitatea de a evalua efectele și de a determina valorile LC_{50} .
23. Un control pozitiv la o concentrație fixă de 4 mg/l 3,4-dicloranilină se efectuează pentru fiecare lot de ouă utilizate pentru testare.
24. În cazul în care se utilizează un solvent, un grup suplimentar de 20 de embrioni este expus solventului pe o placă separată cu 24 de godeuri, servind astfel drept probă de control cu solvent. Pentru ca testul să fie considerat acceptabil, trebuie să se demonstreze că solventul nu are efecte semnificative asupra momentului de eclozare, asupra supraviețuirii și că nu produce alte efecte adverse asupra embrionilor (a se vedea punctul 8c).

Începerea expunerii și durata testului

25. Testul începe cât mai curând posibil după fertilizarea ouălor și se încheie după 96 de ore de expunere. Embrionii trebuie să fie imersați în soluțiile de testare înainte de diviziunea blastodiscului sau cel târziu până în stadiul diviziunii în 16 celule. Pentru a începe expunerea cu o întârziere minimă, cel puțin de două ori mai multe ouă necesare pentru fiecare grup supus tratamentului sunt alese aleatoriu și transferate în concentrațiile și controalele respective (de exemplu, în 100 ml de vase de cristalizare; ouăle trebuie să fie complet acoperite) nu mai târziu de 90 de minute după fertilizare.
26. Ouăle fecundate viabile trebuie separate de ouăle nefertilizate și transferate în plăci cu 24 de godeuri condiționate în prealabil timp de 24 de ore și reumplute cu 2 ml/godeu de soluții de testare proaspăt pregătite în cel mult 180 de minute după fertilizare. Cu ajutorul stereomicroscopiei (de preferință cu o capacitate de mărire de ≥ 30), se vor selecta ouăle fertilizate supuse divizării și care nu prezintă iregularități evidente în timpul divizării (de exemplu, asimetrie, formare de vezicule) sau leziuni ale corionului. Pentru colectarea de ouă și separare, a se vedea apendicele 3 figurile 1 și 3, precum și apendicele 4 figura 2.

Distribuția de ouă pe plăcile cu 24 de godeuri

27. Ouăle se distribuie în plăci cu godeuri în următoarele numere (a se vedea, de asemenea, apendicele 4 figura 1)
- 20 de ouă pe o placă pentru fiecare concentrație de testare;
 - 20 de ouă ca și control solvent pe o placă (dacă este necesar);
 - 20 de ouă ca și control pozitiv pe o placă;
 - 4 ouă în apă de diluție în calitate de control intern pe fiecare dintre plăcile de mai sus;
 - 24 de ouă în apă de diluție în calitate de control negativ pe o placă.

Observații

28. Observațiile apicale efectuate pe fiecare embrion testat includ: coagularea embrionilor, lipsa formării de somite, lipsa desprinderii cozii și lipsa bățăilor inimii (tabelul 1). Aceste observații sunt utilizate pentru a determina letalitatea: Orice rezultat pozitiv pentru oricare dintre aceste observații indică faptul că embrionul de pește-zebră este mort. Suplimentar, se înregistrează eclozarea în grupurile supuse tratamentului și în grupurile de control în fiecare zi începând după 48 de ore. Observațiile sunt înregistrate odată la 24 de ore, până la finalul testului.

Tabelul 1

Observațiile apicale de toxicitate acută la embrionii de pește-zebră la 24-96 de ore după fertilizare

	Timpi de expunere			
	24 de ore	48 de ore	72 de ore	96 de ore
Embrioni coagulați	+	+	+	+
Lipsa formării de somite	+	+	+	+
Nedesprinderea cozii	+	+	+	+
Absența bățăilor inimii		+	+	+

29. *Coagularea embrionului*: Embrionii coagulați au o culoare alb-lăptos și par întunecați la microscop (a se vedea apendicele 5 figura 1). Numărul de embrioni coagulați se determină după 24, 48, 72 și 96 de ore.
30. *Lipsa formării de somite*: La o temperatură de 26 ± 1 °C, aproximativ 20 de somite sau format după 24 de ore (a se vedea apendicele 5 figura 2) într-un embrion de pește-zebră cu dezvoltare normală. Un embrion normal dezvoltat prezintă mișcări spontane (contractări orizontale). Mișcările spontane indică formarea de somite. Absența somitelor se înregistrează după 24, 48, 72 și 96 de ore. Lipsa formării de somite după 24 de ore ar putea fi datorată unei întârzieri generale de dezvoltare. Cel târziu după 48 de ore, formarea de somite ar trebui să fie dezvoltată. Dacă nu, embrionii sunt considerați morți.
31. *Lipsa desprinderii cozii*: La un embrion de pește-zebră dezvoltat normal, desprinderea cozii (a se vedea apendicele 5 figura 3) de sac se observă în urma elongării posterioare a corpului embrionic. Absența desprinderii cozii este înregistrată după 24, 48, 72 și 96 de ore.
32. *Absența bățăilor inimii*: La un embrion de pește-zebră dezvoltat normal la o temperatură de 26 ± 1 °C, pulsul este vizibil după 48 de ore (a se vedea apendicele 5 figura 4). Se va acorda o atenție deosebită atunci când se înregistrează acest punct final, având în vedere că bățile neregulate *nu* trebuie să fie considerate letale. În plus, bățile inimii care sunt vizibile fără circulație în aorta abdominală nu sunt considerate letale. Pentru a înregistra acest punct final, embrionii care nu prezintă nicio bătaie a inimii trebuie observați sub o mărire de 80 de ori timp de cel puțin un minut. Absența bățăilor inimii este înregistrată după 48, 72 și 96 de ore.
33. Ratele de eclozare ale tuturor grupurilor supuse tratamentului și ale celor de control trebuie înregistrate și raportate începând după 48 de ore. Deși eclozarea nu constituie un punct final folosit pentru calcularea LC₅₀, aceasta asigură expunerea embrionului fără o potențială funcție de blocare a corionului, ceea ce ar putea contribui la interpretarea datelor.
34. Descrieri detaliate ale dezvoltării normale (35), precum și exemple de dezvoltare anormală la embrionii de pește-zebră sunt ilustrate în apendicele 3 și 5.

Măsurători analitice

35. La începutul și la sfârșitul testului, se vor măsura pH-ul, duritatea totală și conductivitatea în proba (probele) de control și în cea mai mare concentrație a substanței chimice de testare. În sistemele de reinnoire în regim semistatic, pH-ul trebuie măsurat înainte și după reinnoirea apei. Se măsoară concentrația de oxigen dizolvat la sfârșitul testului în probele de control negativ și concentrația cea mai mare de testare cu embrioni viabili, unde trebuie să fie în conformitate cu criteriile de validitate a testului (a se vedea punctul 8f). În cazul în care există preocupări că temperatura variază în rândul plăcilor cu 24 de godeuri, temperatura este măsurată în trei vase selectate în mod aleatoriu. Temperatura ambientală trebuie să fie înregistrată, de preferință, în mod continuu pe perioada testului sau cel puțin zilnic.
36. Într-un sistem static, concentrația substanței chimice de testare trebuie să fie măsurată cel puțin în cea mai scăzută și cea mai mare concentrație de testare, dar de preferință în toate tratamentele, la începutul și la sfârșitul testului. La testele (de reinnoire) în regim semistatic, în cazul în care concentrația substanței chimice de testare este preconizată să rămână în intervalul de $\pm 20\%$ din valorile nominale, se recomandă, cel puțin, ca cea mai mare și cea mai scăzută concentrație de testare să fie analizate atunci când sunt proaspăt pregătite și imediat înainte de reinnoire. La testele în care concentrația substanței testate nu se preconizează să rămână în intervalul de $\pm 20\%$ din valoarea nominală, toate concentrațiile de testare trebuie analizate atunci când sunt proaspăt preparate și imediat înainte de reinnoire. În cazul unui volum insuficient pentru analiză, se poate dovedi utilă fuzionarea soluțiilor de testare sau utilizarea unor camere surogat din același material și cu același raport volum/suprafață ca plăcile cu 24 de godeuri. Se recomandă ca rezultatele să fie fundamentate pe concentrații măsurate. Atunci când concentrațiile nu se încadrează în intervalul de 80-120 % din concentrația nominală, concentrațiile de efect trebuie exprimate în legătură cu media geometrică a concentrațiilor măsurate; pentru detalii suplimentare a se vedea capitolul 5 din Documentul de orientare al OCDE privind testarea toxicității acvatică a substanțelor și amestecurilor dificile (28).

TEST LA VALORI-LIMITĂ

37. Folosind procedurile descrise în această metodă de testare, un test la valori-limită poate fi efectuat la 100 mg/l din substanța chimică de testare sau la limita sa de solubilitate în mediul de testare (oricare este mai scăzută) pentru a demonstra că LC_{50} este mai mare decât această concentrație. Testul la valori-limită trebuie să se efectueze folosind 20 de embrioni aflați sub tratament, controlul pozitiv și – dacă este necesar – în controlul solvent și 24 de embrioni în controlul negativ. În cazul în care procentul de letalitate la concentrația testată depășește mortalitatea în controlul negativ (sau controlul solvent) cu 10 %, se efectuează un studiu complet. Trebuie înregistrate toate efectele observate. În cazul în care mortalitatea depășește 10 % în controlul negativ (sau controlul solvent), testul devine nul și trebuie repetat.

DATE ȘI RAPORTARE**Interpretarea rezultatelor**

38. În cadrul acestui test, godeurile individuale sunt considerate duplicate independente pentru analiza statistică. Procentele de embrioni pentru care cel puțin una dintre observațiile apicale este pozitivă în 48 și/sau 96 de ore sunt reprezentate față de concentrațiile de testare. Pentru a calcula pantele curbei, valorile LC_{50} și limitele de încredere (95 %), se vor aplica metode statistice adecvate (38) și se va consulta Documentul de orientare al OCDE privind abordările curente în analiza statistică a datelor de ecotoxicitate (39).

Raport de testare

39. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele date:

Substanța chimică testată:

Substanță mono-constituent

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

- identificarea chimică, precum numele IUPAC sau CAS, numărul CAS, codul SMILES sau InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților ca fiind adecvată și practic realizabilă etc. (inclusiv conținutul în carbon organic, dacă este necesar).

Substanță multi-constituent, UVCB și amestecuri:

- în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Organisme de testare:

- numele științific, sușa, sursa și metoda de colectare a ouălor fertilizate și manipularea ulterioară.

Condiții de testare:

- procedura de testare utilizată (de exemplu, reînnoire semistatică);
- perioada de expunere la lumină;
- conceptul de testare (de exemplu, numărul de camere de testare, tipurile de controale);
- caracteristicile de calitate a apei în menținerea peștilor (de exemplu, pH, duritate, temperatură, conductivitate, oxigen dizolvat);
- concentrația oxigenului dizolvat, pH, duritate totală, temperatura și conductivitatea soluțiilor de testare la început și după 96 de ore;
- metoda de preparare a soluțiilor stoc și a soluțiilor de testare, precum și frecvența de reînnoire;
- justificarea utilizării unui solvent și justificarea alegerii solventului, dacă este altul decât apa;
- concentrațiile de testare nominale și rezultatul tuturor analizelor pentru determinarea concentrației substanței de testare în vasele de testare; eficiența de recuperare a metodei și limita de cuantificare (LoQ) trebuie raportate, de asemenea;
- date care să demonstreze că s-au îndeplinit criteriile de validitate a ratei de supraviețuire globală în cazul probelor de control;
- rata de fertilizare a ouălor;
- rata de eclozare în grupul supus tratamentului și cel de control.

Rezultate:

- concentrația maximă care nu provoacă mortalitate pe durata testului;
- concentrația minimă care provoacă o mortalitate de 100 % pe durata testului;
- mortalitatea cumulată pentru fiecare concentrație la momentele de observare recomandate;
- valorile LC₅₀ la 96 de ore (și opțional la 48 de ore) pentru mortalitate cu limite de încredere de 95 %, dacă este posibil;
- graficul curbei concentrație-mortalitate la sfârșitul testului;
- mortalitatea din cadrul probelor de control (controale negative, plăci de control intern, precum și control pozitiv și orice fel de control cu solvent utilizat);
- date privind rezultatul fiecăreia dintre cele patru observații apicale;
- incidența și descrierea anomaliilor morfologice și fiziologice, dacă este cazul (a se vedea exemplele din apendicele 5 figura 2);
- incidente care au survenit pe parcursul testului și care ar fi putut influența rezultatele;

- analiza statistică și interpretarea datelor (analiza probit, modelul de regresie logistică și media geometrică pentru LC_{50});
- panta și limitele de încredere ale regresiei curbei (transformate) concentrație-răspuns.

Orice abatere de la metoda de testare și explicațiile relevante.

Discutarea și interpretarea rezultatelor.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Paris.
- (2) OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Paris.
- (3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute fish LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87-102.
- (4) ISO (2007) International Standard Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.
- (5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) – a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.
- (6) Schulte, C. and Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test – preliminary results. ATLA 22, 12-19.
- (7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Germany.
- (8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087-2102.
- (9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.
- (10) Kammann, U., Vobach, M. and Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97-102.
- (11) Groth, G., Kronauer, K. and Freundt, K.J. (1994) Effects of N,N-dimethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. In Vitro 8: 401-406.
- (12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with N-methylamine, N,N-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, N-methylaniline, N,N-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 878-882.
- (13) Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566-571.
- (14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. and Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024-3031.
- (15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. and Carr G. J. (2013). Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32: 1768-1783.

- (16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196-209
- (17) Capitolul C.4 din prezenta anexă: Biodegradabilitate rapidă.
- (18) Capitolul C.29 din prezenta anexă: Biodegradabilitate rapidă, CO₂ în vase sigilate.
- (19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25-36.
- (20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Reprod. Toxicol. 33: 133-141.
- (21) Incardona, J.P., Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: 242-249.
- (22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Pharmacol. 253: 244-252.
- (23) Capitolul C.48 din prezenta anexă: Test de reproducere cu durată scurtă la pești. A se vedea apendicele 4a.
- (24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendler, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol. in vitro 23: 1436-1442.
- (25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klammer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35, 4097-4102.
- (26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1676-1682.
- (27) ISO (1996) International Standards. Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method. Available: [http://www.iso.org].
- (28) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.
- (29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. J. Fish Biol. 10: 121-173.
- (30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5th edition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.
- (31) Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>
- (32) European Commission (2007) Commission recommendation 2007/526/EC of 18 June 2007 on guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes (notified under document number C(2007) 2525) [<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:EN:PDF>]
- (33) European Union (2010) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. OJ L 276, 20.10.2010, p. 33.

- (34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173-181.
 - (35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.
 - (36) Capitolul C.2 din prezenta anexă: *Daphnia* sp., test de imobilizare acută.
 - (37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect concentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970-1978
 - (38) ISO (2006) International Standard. Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Available: [<http://www.iso.org>].
 - (39) OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.
 - (40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper „Fish embryo toxicity assays”. UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 pp.
-

Apendicele 1

DEFINIȚII

Punct final apical: care provoacă efecte la nivel de populație.

Blastulă: o formațiune celulară în jurul polului animal care acoperă o anumită parte a sacului.

Substanță chimică: o substanță sau un amestec

Epibolie: o proliferare masivă a celulelor predominant epidermale în faza de gastrulație a embrionului și mișcarea acestora dinspre partea dorsală către cea ventrală, prin care straturile celulei entodermale sunt internalizate într-un proces asemănător invaginației, iar sacul este încorporat în embrion.

Test în regim dinamic: un test cu flux continuu de soluții de testare prin sistemul de testare pe parcursul perioadei de expunere.

Placă de control intern: controlul intern constând în 4 godeuri umplute cu apă de diluție per placa cu 24 de godeuri pentru a identifica o potențială contaminare a plăcilor de către producător sau de către cercetător pe durata procedurii, precum și orice efect de placă ce ar putea să influențeze rezultatul testului (de exemplu, gradient de temperatură).

IUPAC: Uniunea internațională de chimie pură și aplicată

Apa de întreținere: apa în care are loc creșterea peștelui adult.

Concentrația letală medie (LC₅₀): concentrația unui produs chimic de testare care este considerat letal pentru 50 % din organismele testate pe durata testului.

Test de reînnoire semistatic: un test cu reînnoirea periodică a soluțiilor de testare după perioade definite (de exemplu, la fiecare 24 de ore).

SMILES: Specificație pentru înregistrarea simplificată a structurii moleculare sub formă de text liniar.

Somite: în procesul de dezvoltare a embrionului vertebrat, somitele constituie mase de mezoderm distribuite lateral de tubul neural, care se vor transforma ulterior în dermă (dermatom), mușchi scheletic (miotom) și vertebre (sclerotom).

Test static: un test în care soluțiile de testare rămân neschimbate pe toată durata testului.

Substanță chimică de testare: orice substanță sau amestec testate cu ajutorul prezentei metode de testare.

UVCB: substanțele cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice

Apendicele 2

**ÎNȚREȚINEREA, REPRODUCEREA ȘI CONDIȚIILE TIPICE PENTRU TESTELE DE TOXICITATE ACUTĂ
PE EMBRIONII DE PEȘTE-ZEBRĂ**

Peștele-zebră (<i>Danio rerio</i>)		
Originea speciei	India, Birmania, Malacca, Sumatra	
Dimorfism sexual	Femele: abdomen proeminent când poartă ouă Masculi: mai subțiri, nuanță portocalie între dungile longitudinale albastre (în special evidentă la înotătoarea anală)	
Regimul de hrănire	Hrană uscată sub formă de fulgi (maxim 3 % din greutatea peștelui zilnic) de 3-5 ori pe zi; <i>nauplius de Artemis</i> și/sau dafnii de mărime adecvată provenind din sursă necontaminată. Hrănirea cu hrană vie reprezintă o sursă de îmbogățire a mediului de viață, prin urmare, trebui să se ofere hrană vie ori de câte ori este posibil. Pentru a garanta o calitate optimă a apei, hrana în exces și materiile fecale trebuie îndepărtate la aproximativ o oră după hrănire.	
Greutatea aproximativă a peștilor adulți	Femele: 0,65 ±0,13 g Masculi: 0,5 ±0,1 g	
Întreținerea peștilor părinți	Iluminarea	Becuri fluorescente (spectru larg); 10-20 μE/m ² /s, 540-1080 lucși sau 50-100 ft-c (niveluri ambientale de laborator); perioadă de expunere la lumină de 12-16 ore
	Temperatura apei	26 ±1 °C
	Calitatea apei	O ₂ ≥80 % saturare, duritate: de exemplu ~30-300 mg/l CaCO ₃ , NO ₃ ⁻ : ≤48mg/l, NH ₄ ⁺ și NO ₂ ⁻ : <0,001 mg/l, clor rezidual <10 μg/l, clor organic total <25 ng/l, pH = 6,5 – 8,5
	Alte criterii de calitate a apei	Particule în suspensie < 20 mg/l, carbon organic total < 2 mg/l, Total pesticide organofosforice totale < 50 ng/l, pesticide organoclorurate totale plus bifenili policlorurați < 50 ng/l
	Mărimea rezervorului de întreținere	De exemplu, 180 l, 1 pește/l
	Epurarea apei	Permanent (filtrare cu cărbune); alte posibilități includ combinații cu întreținere prin reînnoire semistatică sau în regim dinamic cu reînnoirea continuă a apei
	Raportul recomandat de masculi și femele pentru reproducere	2:1 (sau eliberare de gameți în masă)
Bazine pentru eliberarea de gameți	de exemplu, bazine de 4 l echipate cu un grilaj din oțel la fund și plante artificiale ca stimulent pentru eliberarea de gameți; încălzitoare externe sau eliberare de gameți în masă în cadrul bazinelor de întreținere	
Structura și aspectul ouălor	Corion stabil (<i>adică</i> foarte transparent, ne-lipicios, diametru ~ 0,8-1,5 mm)	
Rata de reproducere	O femelă matură depune cel puțin 50-80 de ouă pe zi. În funcție de sușă, ratele de depunere a ouălor pot fi considerabil mai mari. Rata de fertilizare trebuie să fie ≥ 70 %. Pentru peștii care eliberează gameți pentru prima dată, ratele de fertilizare a ouălor pot fi mai mici primele dați.	
Tipul testului	Reînnoire statică, semi-statică, în regim dinamic, 26 ±1°C, camere de testare condiționate la 24 de ore (de exemplu, plăci cu 24 de godeuri cu 2,5-5 ml per cavitate)	

Apendicele 3

DEZVOLTAREA NORMALĂ LA PEȘTELE-ZEBRĂ LA 26 °C

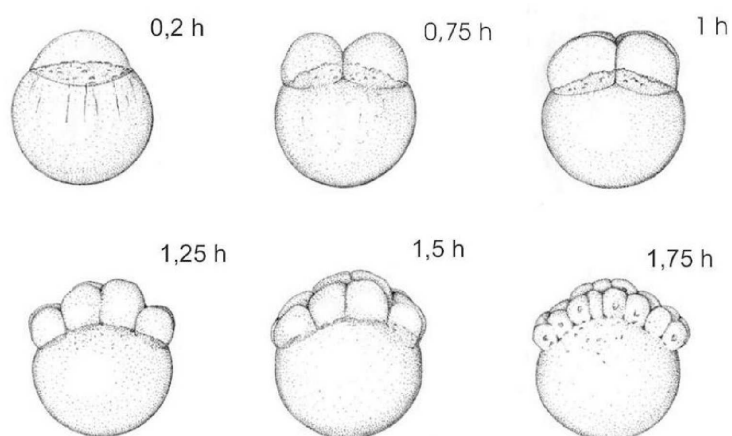


Figura 1: Stadii selectate ale dezvoltării timpurii la peștele-zebră (*Danio rerio*) 0,2-1,75 ore după fertilizare (din Kimmel et.al., 1995, (35)). Succesiunea în timp a dezvoltării normale poate fi utilizată pentru diagnosticarea fertilizării și a viabilității ouălor (a se vedea punctul 26: Selecția de ouă fertilizate).

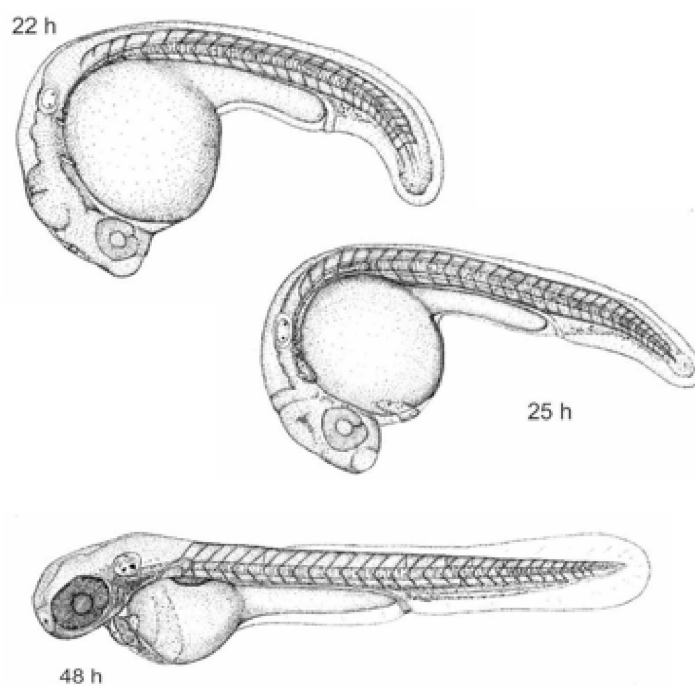


Figura 2: Stadii selectate din dezvoltarea târzie a peștelui-zebră (*Danio rerio*) (embrion fără corion pentru a optimiza vizibilitatea): 22 – 48 ore după fertilizare (din Kimmel et al., 1995 (35)).

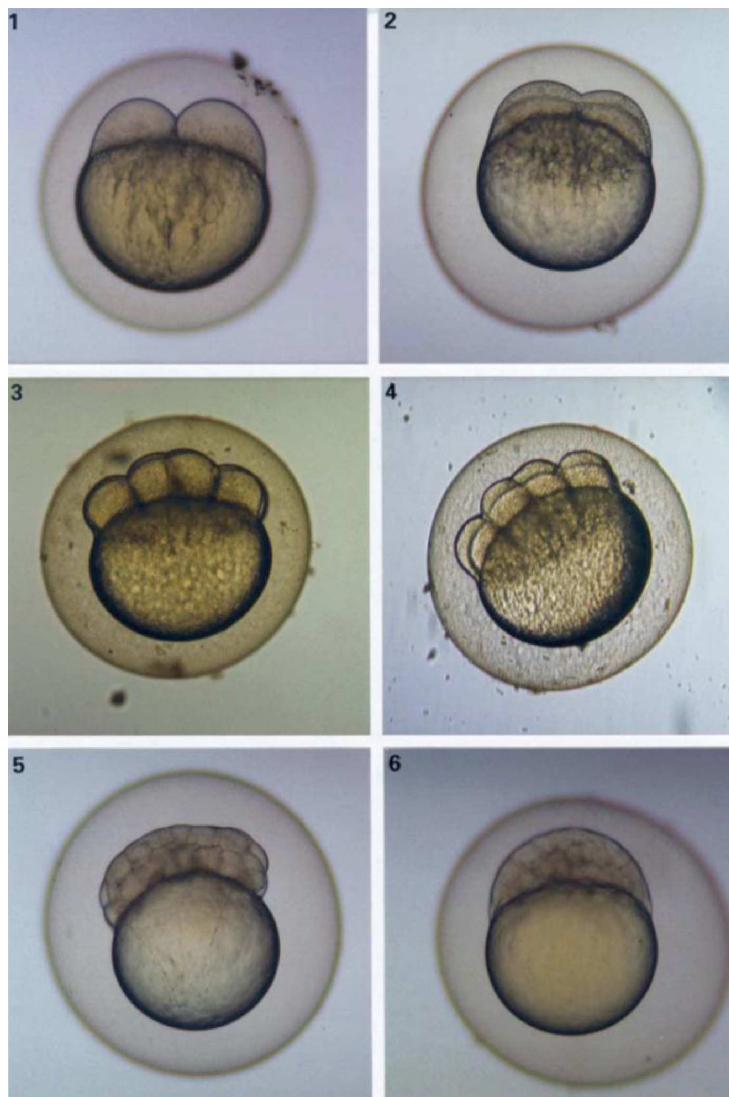
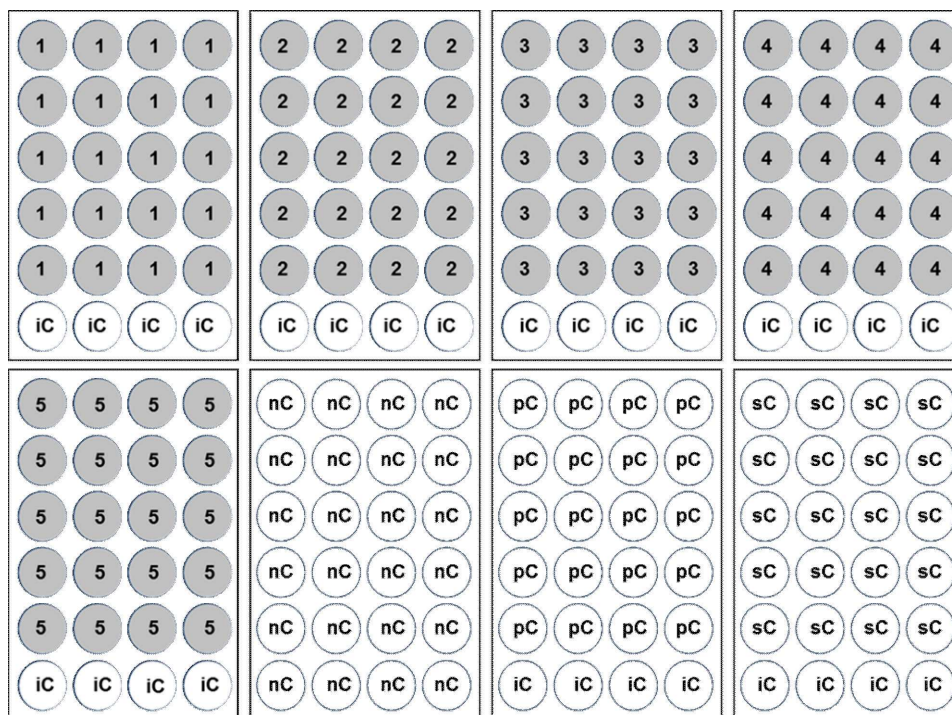


Figura 3: Dezvoltarea normală a embrionilor de pește-zebră (*Danio rerio*): (1) 0,75 h, stadiul diviziunii în 2 celule; (2) 1 h, stadiul diviziunii în 4 celule; (3) 1,2 h, stadiul diviziunii în 8 celule; (4) 1,5 h, stadiul diviziunii în 16 celule; (5) 4,7 h, începutul epiboliei; (6) 5,3 h, aprox. 50 % epibolie (din Braunbeck & Lammer 2006 (40)).

Apendicele 4

Figura 1

Dispunerea plăcilor cu 24 de godeuri



1-5 = cinci concentrații de testare/substanță chimică;

Mn = control negativ (apa de diluție);

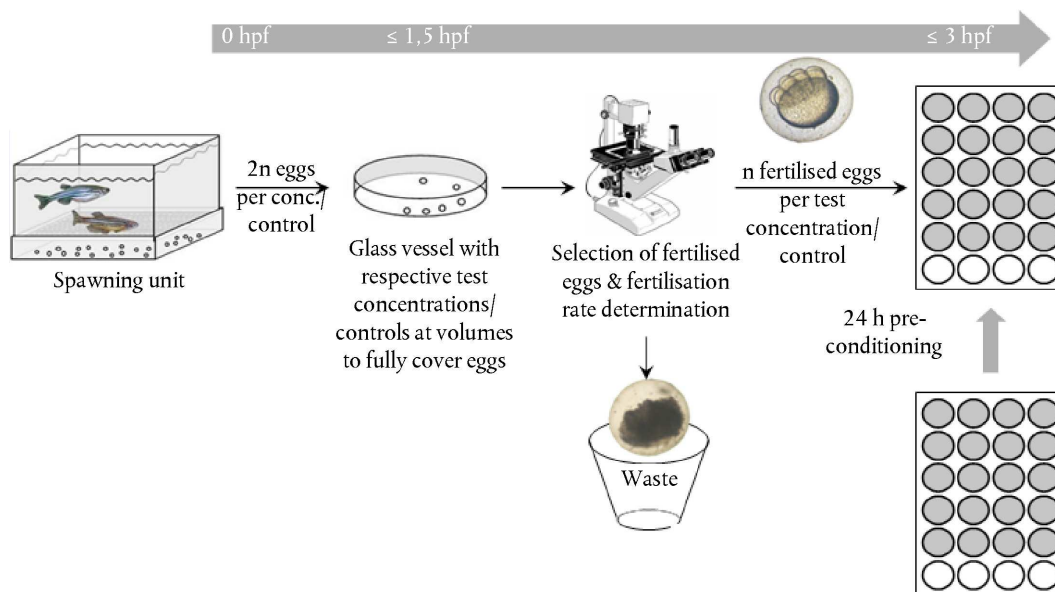
iC = control intern reprezentat de placă

Mp = control pozitiv (3,4-DCA 4mg/l);

Ms = control solvent

Figura 2

Schema procedurii testului de toxicitate acută pe embrionii de pește-zebră (de la stânga la dreapta) producția de ouă, colectarea de ouă, pre-expunere imediat după fertilizare în vase de sticlă, selecția de ouă fertilizate cu un microscop inversat sau binocular și distribuția de ouă fertilizate în plăci cu 24 de godeuri preparate cu concentrații de testare/de control, n = numărul de ouă necesare pentru fiecare concentrație de testare/de control (aici, 20), HPF = ore post-fertilizare.



Apendicele 5

ATLASUL PUNCTELOR FINALE LETALE PENTRU TESTUL DE TOXICITATE ACUTĂ PE EMBRIONII DE PEȘTE-ZEBRĂ

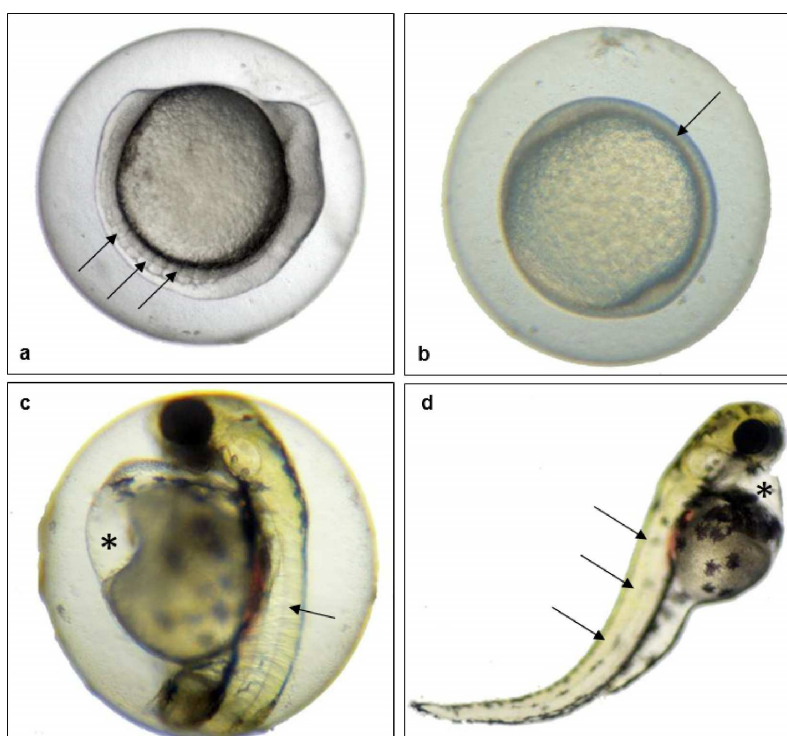
Următoarele puncte finale apicale indică toxicitate acută și, prin urmare, decesul peștilor. *coagularea embrionului, lipsa desprinderii cozii, lipsa formării de somite și lipsa bățăilor inimii.* Au fost selectate următoarele micrografii pentru a ilustra aceste puncte finale:

Figura 1

Coagularea embrionului

În lumină naturală puternică, embrionii de pește-zebră coagulați prezintă o varietate de incluziuni intransparențe.

Figura 2

Lipsa formării de somite

Deși prezintă deja întârzieri în dezvoltare cu aproximativ 10 ore, embrionul de pește-zebră cu vârsta de 24 de ore în (a) prezintă somite bine dezvoltate (→), în timp ce embrionul de la (b) nu prezintă niciun semn de formare de somite (→). Deși prezintă un edem pronunțat al sacului vitelin (*), embrionul de pește-zebră cu vârsta de 48 de ore prezintă în (c) o formare distinctă de somite (→), în timp ce embrionul de pește-zebră cu vârsta de 96 de ore descris în (d) nu prezintă niciun semn de formare de somite (→). A se nota, de asemenea, curbura spinală (scolioză) și edemul pericardic la embrionul prezentat în (d).

Figura 3

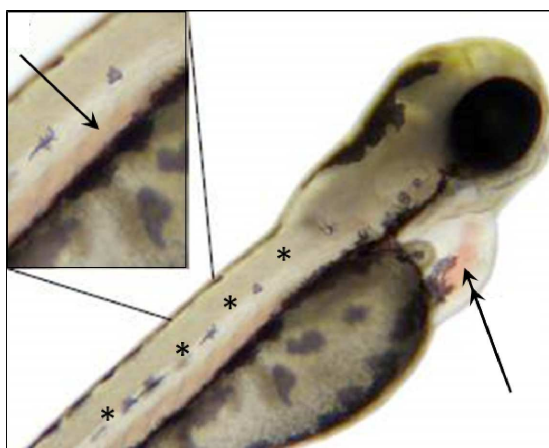
Nedesprinderea mugurelui terminal, vedere laterală



(a: → embrion de pește-zebră cu vârsta de 96 de ore). A se remarca, de asemenea, lipsa mugurelui ocular (*).

Figura 4

Absența bătăilor inimii



Absența bătăilor inimii este, prin definiție, greu de ilustrat prin micrografie. Absența bătăilor inimii este indicată prin lipsa convulsiilor inimii (săgeată dublă). Imobilitatea celulelor sangvine în, de exemplu, aorta abdominală (→) nu este un indicator pentru lipsa bătăilor inimii. A se remarca, de asemenea, lipsa formării de somite în acest embrion (*, omogen mai degrabă decât apariția segmentară a țesuturilor musculare). Durata de observare pentru a înregistra absența bătăilor inimii trebuie să fie de cel puțin un minut, cu o mărire de cel puțin de 80 de ori.

C.50 Test de toxicitate pe *Myriophyllum spicatum* fără sediment

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea nr. 238 (2014). Aceasta este concepută pentru a evalua toxicitatea substanțelor chimice asupra *Myriophyllum spicatum*, o plantă acvatică dicotiledonată submersă, specie din familia peniței. Acesta se bazează pe o metodă de testare existentă ASTM (1) modificată într-un sistem de testare fără sedimente (2) pentru a estima ecotoxicitatea intrinsecă a substanțelor chimice de testare (independent de raportul distribuție-comportament a substanței chimice de testare dintre apă și sediment). Un sistem de testare fără sediment are o complexitate analitică scăzută (doar în faza apoasă), iar rezultatele pot fi analizate în paralel și/sau comparativ cu cele obținute în urma testului pe *Lemna* sp. (3); în plus, condițiile sterile necesare permit menținerea efectelor microorganismelor și algelor (asimilarea /deteriorarea substanței etc.) la un nivel cât mai scăzut posibil. Acest test nu înlocuiește alte teste de toxicitate acvatică, ci mai degrabă le completează pentru a permite astfel o evaluare cât mai completă a riscurilor și pericolelor pentru plantele acvatice. Metoda de testare a fost validată printr-un test circular (4).
2. Sunt prezentate detalii privind testarea cu reînnoirea (semistatică) și fără reînnoirea (statică) a soluției de testare. În funcție de obiectivele testului și de cerințele de reglementare, se recomandă utilizarea metodei semistatice, de exemplu pentru substanțe care se pierd cu rapiditate din soluție ca urmare a volatilizării, a adsorbției, a hidrolizei, a fotodegradării, a precipitării sau a biodegradării. Alte orientări sunt disponibile în referința (5). Această metodă de testare se aplică substanțelor pentru care metoda de testare a fost validată ([a se vedea detalii în raportul testului circular (4)] sau formulelor, sau amestecurilor cunoscute; în cazul în care se testează un amestec, componenții acestuia trebuie identificați și cuantificați pe cât posibil. Metoda de testare cu *Myriophyllum spicatum* fără sediment completează testul de toxicitate cu *Myriophyllum spicatum* în sistem apă-sediment. Înainte de utilizarea acestei metode de testare pentru testarea unui amestec destinat unui scop de reglementare, trebuie să se examineze dacă și, în caz afirmativ, motivele pentru care aceasta poate oferi rezultate adecvate în acest scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

PRINCIPIUL TESTULUI

3. Culturile de plante cu creștere continuă de *Myriophyllum spicatum* (numai în mediu Andrews modificat, a se vedea appendicele 2) se lasă să crească în monoculturi, în concentrații diferite ale substanței de testare, pentru o perioadă de 14 zile într-un sistem de testare fără sediment. Obiectivul testului este de a cuantifica efectele substanței chimice asupra creșterii vegetative în această perioadă, pe baza evaluărilor variabilelor de măsurare selectate. Creșterea lungimii lăstarilor, a ramurilor laterale și a rădăcinilor, precum și dezvoltarea greutatea în stare proaspătă și a greutatea uscate a vârtejurilor constituie variabilele de măsurare. De asemenea, se țin cont de variațiile calitative distinctive ale organismelor de testare, cum ar fi deformarea sau cloroza și necroza sugerate de îngălbenire, înălbire sau colorarea în maro. Pentru cuantificarea efectelor substanțelor chimice, creșterea în soluțiile de testare se compară cu cea a probelor de control, iar concentrația care provoacă o inhibare specificată de $x\%$ a creșterii este determinată și exprimată ca EC $_x$: „ x ” poate avea orice valoare în funcție de cerințele de reglementare, de exemplu, EC $_{10}$, EC $_{20}$, EC $_{50}$. Trebuie remarcat faptul că estimările valorilor EC $_{10}$ și EC $_{20}$ sunt fiabile și adecvate doar în cadrul testelor în care coeficienții de variație la plantele de control se situează sub nivelul estimat al efectului, și anume coeficienții de variație trebuie să fie $< 20\%$ pentru o estimare solidă a unei EC $_{20}$.
4. Se vor determina atât rata medie specifică de creștere (estimată pe baza evaluărilor lungimii lăstarului principal și a altor trei variabile suplimentare de măsurare), cât și randamentul (estimată pe baza creșterii lungimii lăstarului principal și a altor trei variabile suplimentare de măsurare) la plantele tratate și netratate. Viteza specifică de creștere (r) și randamentul (y) sunt utilizate ulterior pentru a determina $E_r C_x$ (de exemplu, $E_r C_{10}$, $E_r C_{20}$, $E_r C_{50}$) și, respectiv, $E_y C_x$ (de exemplu, $E_y C_{10}$, $E_y C_{20}$, $E_y C_{50}$).
5. În plus, concentrația cea mai mică la care este observat un efect (LOEC) și concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC) se pot determina statistic.

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTARE

6. O metodă analitică având o sensibilitate adecvată pentru cuantificarea substanței chimice de testare în mediul de testare trebuie să fie disponibilă. Informațiile privind substanța chimică de testare care se pot dovedi utile pentru stabilirea condițiilor de testare includ formula structurală, puritatea și impuritățile, solubilitatea în apă, stabilitatea în apă și la lumină, constanta de disociere (pK_a), coeficientul de partiție octanol/apă (K_{ow}), presiunea de vapori și biodegradabilitatea. Solubilitatea în apă și presiunea vaporilor pot fi folosite pentru a calcula constanta legii lui Henry, care va arăta dacă sunt probabile pierderi semnificative ale substanței chimice de testare în perioada de testare. Aceasta va indica dacă este necesară adoptarea anumitor măsuri pentru limitarea unor astfel de pierderi. Dacă informațiile privind solubilitatea și stabilitatea substanței de testare sunt incerte, se recomandă ca acestea să fie evaluate în condițiile de testare, și anume mediul de creștere, temperatura și condițiile de iluminare care vor fi folosite la test.
7. Controlul pH-ului mediului de testare este deosebit de important, de exemplu în cazul testării unor metale sau substanțe instabile din punct de vedere hidrolitic. Îndrumări suplimentare privind substanțele de testare cu proprietăți fizico-chimice care le fac dificil de testat sunt prezentate într-un document de orientare al OCDE (5).

VALIDITATEA TESTULUI

8. Pentru ca testul să fie valid, perioada de duplicare a lungimii lăstarului principal din proba de control trebuie să fie mai mică de 14 zile. Folosind mediile și condițiile de testare descrise în această metodă de testare, acest criteriu poate fi îndeplinit prin utilizarea unui test semistatic sau static.
9. Coeficientul mediu de variație pentru randament bazat pe măsurători ale greutateii lăstarilor în stare proaspătă (și anume, de la începutul și până la sfârșitul testului) și variabilele suplimentare de măsurare (a se vedea punctul 37) în culturile de control nu trebuie să depășească 35 % între duplicate.
10. Mai mult de 50 % din numărul probelor duplicat din grupul de control se păstrează sterile pe parcursul perioadei de expunere de 14 zile, ceea ce înseamnă lipsa în mod evident a contaminării cu alte organisme precum alge, ciuperci și bacterii (soluție clară). *Notă:* Orientări privind modul de evaluare a sterilității sunt prezentate în raportul testului circular (4).

SUBSTANȚA CHIMICĂ DE REFERINȚĂ

11. Substanța (substanțele) chimică(e) de referință, cum ar fi 3,5-diclorfenol folosit în testul circular (4), poate (pot) fi testată(e) ca metodă de verificare a procedurii de testare; pe baza datelor testului circular, media valorilor EC_{50} pentru 3,5-DCF pentru variabile de răspuns diferite (a se vedea punctele 37-41 din această metodă de testare) se situează între 3,2 mg/l și 6,9 mg/l (a se vedea raportul testului circular pentru detalii privind intervalul de încredere pentru valorile respective). Este recomandabil ca o substanță chimică de referință să fie testată cel puțin de două ori pe an sau, dacă testarea se desfășoară mai puțin frecvent, în paralel cu determinarea toxicității unei substanțe chimice de testare.

DESCRIEREA METODEI

Aparatură

12. Toate echipamentele care intră în contact cu mediile de testare trebuie să fie confecționate din sticlă sau alt material chimic inert. Recipientele de sticlă folosite pentru cultură și testare trebuie să fie curățate de contaminanții chimici care se pot infiltra în mediul de testare și trebuie să fie sterile. Vasele de testare trebuie să fie suficient de lungi pentru ca lăstarii din vasele de control să crească în faza apoasă fără a atinge suprafața mediului de testare la sfârșitul testului. Se recomandă tuburi din sticlă borosilicată cu pereți groși fără margine ridicată, cu un diametru interior de aproximativ 20 mm și o lungime de aproximativ 250 mm, cu capace de aluminiu
13. Întrucât mediul modificat Andrews conține zaharoză (care stimulează creșterea ciupercilor și a bacteriilor), soluțiile de testare trebuie să fie preparate în condiții sterile. Toate lichidele, precum și echipamentele sunt sterilizate înainte de utilizare. Sterilizarea se realizează prin tratarea cu aer încălzit (210 °C) timp de 4 ore sau în autoclavă timp de 20 minute la 121 °C. În plus, toate flacoanele, vasele, bolurile etc. și alte echipamente sunt supuse unui tratament la flacără pe un banc de lucru steril chiar înainte de utilizare.

14. Culturile și vasele de testare nu se păstrează în același loc. Această condiție poate fi îndeplinită prin folosirea unor încăperi, incubatoare sau camere de creștere care reproduc condițiile de mediu separate. Iluminarea și temperatura trebuie să fie controlabile și menținute la un nivel constant.

Organismul de testare

15. *Myriophyllum spicatum* – o plantă acvatică dicotiledonată submersă – este o specie din familia peniței de apă. Între lunile iunie și august, flori discrete roz-albe își fac apariția la suprafața apei. Plantele sunt înrădăcinate în sol prin intermediul unui sistem de rizomi viguroși și pot fi găsite în întreaga emisferă nordică în ape eutrofice, dar nepoluate și mai calcaroase cu substrat noroios. *Myriophyllum spicatum* preferă apa dulce, dar se găsește și în apă salmastră.
16. Pentru testul de toxicitate fără sediment, sunt necesare plante sterile. În cazul în care laboratorul de testare nu are culturi obișnuite de *Myriophyllum spicatum*, plante de testare sterile pot fi obținute de la un alt laborator sau pot proveni de pe teren (nesterile) sau de la un furnizor comercial; dacă plantele provin de pe teren, se va lua în considerare o verificare taxonomică a speciei. Dacă sunt colectate de pe teren sau provin de la un furnizor comercial, plantele trebuie sterilizate (1) și menținute în cultură în același mediu ca cel folosit pentru testare timp de cel puțin opt săptămâni înainte de utilizare. Terenurile de pe care s-au colectat culturile inițiale trebuie să fie lipsite de surse evidente de contaminare. Trebuie luate măsuri de precauție pentru a se asigura că se obține specia corectă atunci când se colectează *Myriophyllum spicatum* de pe teren, în special în regiunile în care aceasta se poate încrucișa cu alte specii de *Myriophyllum*. Dacă plantele au fost obținute de la un alt laborator, se vor menține în condiții similare timp de cel puțin trei săptămâni. Sursa plantelor și a speciilor folosite ca material pentru testare se raportează întotdeauna.
17. Calitatea și uniformitatea plantelor folosite pentru testare vor avea o influență semnificativă asupra rezultatului testului și, prin urmare, se vor selecta cu atenție. Se vor folosi plante tinere, cu creștere rapidă, fără leziuni sau decolorări vizibile (cloroză). Detalii privind pregătirea organismelor de testare sunt prezentate în apendicele 4.

Cultivarea

18. În scopul reducerii frecvenței de întreținere a culturii (de exemplu, în situațiile în care nu sunt prevăzute teste cu *Myriophyllum* pentru o anumită perioadă), culturile pot fi menținute în condiții de iluminare și temperatură scăzută ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \pm 2^\circ\text{C}$). Detalii privind culturile sunt prezentate în apendicele 3.
19. Cu cel puțin 14-21 de zile înainte de testare, se transferă un număr suficient de organisme de testare în condiții aseptice într-un mediu steril proaspăt și se cultivă timp de 14-21 de zile în condiții similare cu cele ale testului drept precultură. Detalii privind prepararea unei preculturi sunt prezentate în apendicele 4.

Mediul de testare

20. Pentru testarea cu *Myriophyllum spicatum* într-un sistem fără sediment, se recomandă un singur mediu nutritiv, conform descrierii din apendicele 2. O modificare a mediului Andrews este recomandată pentru cultura și testarea cu *Myriophyllum spicatum*, conform descrierii din referința (1). Din cinci soluții stoc nutritive preparate separat cu adaos de 3 % zaharoză, se va pregăti mediul Andrews modificat. Detalii cu privire la prepararea mediului sunt prezentate în apendicele 2.
21. Pentru a se obține soluțiile de testare (prin diluare, după caz), este necesar un mediu Andrews modificat, concentrat de zece ori. Compoziția acestui mediu este prezentată în apendicele 2.

Soluții de testare

22. Soluțiile de testat se prepară de regulă prin diluarea unei soluții stoc. Soluțiile stoc ale substanței chimice de testare se prepară de preferință prin dizolvarea substanței în apă demineralizată (și anume, distilată sau deionizată). Adăugarea de nutrienți se va realiza prin utilizarea unui mediu Andrews modificat, concentrat de zece ori.

23. Soluțiile stoc ale substanței chimice de testare pot fi sterilizate în autoclavă la 121 °C timp de 20 de minute sau prin filtrare sterilă, cu condiția ca sterilizarea tehnică utilizată să nu denatureze substanța chimică de testare. Soluțiile de testare pot fi preparate, de asemenea, în apă demineralizată sau mediu steril, în condiții de sterilitate. Termostabilitatea și adsorbția pe suprafețe diferite trebuie luate în considerare în momentul alegerii procedurii de sterilizare a soluțiilor stoc ale substanței chimice de testare. Din acest motiv, se recomandă ca soluțiile stoc să fie preparate în condiții sterile, și anume prin utilizarea de materiale sterile pentru dizolvarea substanței chimice de testare în condiții sterile (de exemplu, sterilizarea la flacără, hote cu flux laminar etc.) în apă sterilă. Această tehnică de preparare a soluțiilor stoc sterile este valabilă atât pentru substanțe, cât și pentru amestecuri.
24. Concentrația maximă de testare a substanței chimice de testare nu trebuie să depășească în mod normal solubilitatea acesteia în apă în condițiile de testare. Pentru substanțele chimice de testare cu solubilitate scăzută în apă, poate fi necesară prepararea unei soluții stoc concentrată sau dispersia substanței chimice folosind un solvent sau un agent de dispersie organic, pentru a facilita adăugarea de cantități exacte de substanță de testare în mediul de testare și pentru a favoriza dispersia și dizolvarea acesteia. Se vor depune toate eforturile pentru a evita folosirea unor astfel de materiale. Nu se vor folosi solvenți sau agenți de dispersie suplimentari în urma cărora să rezulte fitotoxicitate. De exemplu, solvenții obișnuiți care nu provoacă fitotoxicitate la concentrații de până la 100 µl/l includ acetona și dimetilformamida. Dacă se folosește un solvent sau un agent de dispersie, concentrația sa finală se raportează și se menține la minimum ($\leq 100 \mu\text{l/l}$), iar toate tratamentele și probele de control trebuie să conțină aceeași concentrație de solvent sau de agent de dispersie. Orientări suplimentare privind folosirea agenților de dispersie sunt prezentate în referința (5).

Grupurile de testare și de control

25. Cunoașterea în prealabil a toxicității substanței chimice de testare asupra *Myriophyllum spicatum* în urma unui test de stabilire a intervalului va permite alegerea concentrațiilor potrivite de testare. În testul final de stabilire a toxicității, trebuie să existe în mod normal între cinci (precum în cadrul testului de inhibare a creșterii *Lemna*, capitolul C.26 din prezenta anexă) și șapte concentrații de testare dispuse în serie geometrică; acestea trebuie selectate astfel încât valorile NOEC și EC_{50} să fie cuprinse în intervalul concentrațiilor de testare (a se vedea mai jos). Se preferă ca factorul de separare între concentrațiile de testare să nu depășească 3,2, dar se poate folosi o valoare mai mare în cazul în care curba concentrație-răspuns este plată. Utilizarea a mai puțin de cinci concentrații trebuie justificată. Se folosesc cel puțin cinci probe duplicate pentru fiecare concentrație de testare.
26. La stabilirea intervalului concentrațiilor de testare (pentru testul de stabilire a intervalului și/sau testul final de stabilire a toxicității), trebuie să se rețină următoarele:

Pentru determinarea unei EC_x , concentrațiile de testare trebuie să încadreze valoarea EC_x în scopul asigurării unui nivel de încredere adecvat. De exemplu, dacă se estimează EC_{50} , concentrația cea mai mare de testare trebuie să fie mai mare decât valoarea EC_{50} . Dacă valoarea EC_{50} se află în afara intervalului concentrațiilor de testare, intervalele de încredere aferente vor fi mari și există riscul ca evaluarea corectă a adecvării statistice a modelului să nu fie posibilă;

Dacă se urmărește estimarea LOEC/NOEC, concentrația cea mai scăzută de testare trebuie să fie suficient de scăzută, astfel încât creșterea să nu fie cu mult mai mică decât cea a probei de control. În plus, concentrația cea mai mare de testare trebuie să fie suficient de mare astfel încât creșterea să fie cu mult mai mică decât cea în proba de control. Dacă nu este cazul, testul se va repeta folosind un interval diferit de concentrații (cu excepția cazului în care cea mai mare concentrație se află la limita solubilității sau la concentrația-limită maximă cerută, de exemplu 100 mg/l).

27. Fiecare test trebuie să includă probe de control constând în același mediu nutritiv, același organism de testare (alegerea materialului vegetal cât mai omogen posibil, ramuri laterale proaspete din precultiuri, scurtate la 2,5 cm de la bază), aceleași condiții ambientale și proceduri precum cele din vasele de testare, dar fără substanța chimică de testare. Dacă se folosește un solvent sau agent de dispersie suplimentar, se va include un tratament suplimentar de control cu solventul/agentul de dispersie prezent în aceeași concentrație cu cea din vasele de testare cu substanța chimică de testare. Numărul vaselor de control duplicate (și vasele cu solvenți, dacă este cazul) trebuie să fie de cel puțin zece.

28. Dacă determinarea NOEC nu este necesară, conceptul de testare poate fi modificat în sensul creșterii numărului de concentrații și al reducerii numărului de probe duplicat per concentrație. Cu toate acestea, în orice caz, numărul de probe duplicat de control trebuie să fie de cel puțin zece.

Expunere

29. Ramurile laterale proaspete din precultură scurtate la 2,5 cm de la bază sunt poziționate aleatoriu în vasele de testare în condiții aseptice; fiecare vas de testare trebuie să conțină o ramură laterală de 2,5 cm care să prezinte un meristem apical la un capăt. Materialul vegetal ales trebuie să aibă aceeași calitate în fiecare vas de testare.
30. Vasele de testare vor fi poziționate aleatoriu în incubator pentru a se minimiza influența diferențelor spațiale de intensitate a luminii sau de temperatură. Este necesară, de asemenea, o dispunere fixă sau aleatorie a vaselor (sau o re poziționare mai frecventă) atunci când se efectuează observații.
31. Dacă un test preliminar de stabilitate arată că nu poate fi menținută concentrația substanței de testare (concentrația măsurată scade sub 80 % din concentrația măsurată inițial) pe durata perioadei de testare (14 zile), se recomandă un test semistatic. În acest caz, plantele se expun unor soluții proaspete preparate de testare și de control cel puțin o dată în timpul testului (de exemplu, ziua a 7-a). Frecvența expunerii la un mediu proaspăt va depinde de stabilitatea substanței de testare; pentru menținerea concentrațiilor cât mai aproape de nivelul constant în cazul substanțelor foarte instabile sau volatile, poate fi necesară o frecvență mai mare.
32. Scenariul de expunere prin aplicare foliară (pulverizare) nu este inclus în această metodă de testare.

Condițiile de testare

33. Se va folosi o lumină fluorescentă albă, caldă și/sau rece pentru a asigura o intensitate luminoasă cuprinsă în intervalul $100-150 \mu E m^{-2} s^{-1}$ atunci când este măsurată în radiație activă fotosintetică (400-700 nm) în puncte aflate la distanțe egale de sursa de lumină cu fundul vaselor de testare (echivalent cu 6000 – 9000 luchi) și un ciclu de lumină și întuneric de 16:8 ore. Metoda de detectare și de măsurare a luminii, în special tipul de senzor, va afecta valoarea măsurată. Senzorii sferici (care răspund la lumină din toate unghiurile de deasupra și dedesubtul planului de măsurare) și senzorii „cosinus” (care răspund la lumină din toate unghiurile de deasupra planului de măsurare) sunt preferabili senzorilor unidirecționali și vor da valori mai mari pentru o sursă de lumină multipunct de tipul celei descrise aici.
34. Temperatura din vasele de testare trebuie să fie de $23 \pm 2 ^\circ C$. Se va acorda o atenție sporită devierii pH-ului în cazuri speciale, cum ar fi în cazul testării de substanțe chimice instabile sau de metale; pH-ul trebuie să rămână în intervalul 6-9. Pentru alte orientări, a se vedea referința (5).

Durată

35. Testul se încheie după 14 zile de la transferul plantelor în vasele de testare.

Măsurători și determinări analitice

36. La începutul testului, lungimea lăstarului principal al organismului de testare este de 2,5 cm (a se vedea punctul 29); acesta este măsurat cu o riglă (a se vedea appendicele 4) sau pe baza analizei fotografiei sau a imaginii. Lungimea lăstarului principal al organismului de testare aparent normal sau anormal trebuie să fie stabilită la începutul testului, cel puțin o dată în timpul perioadei de 14 zile, precum și la sfârșitul testului. Notă: Ca o alternativă în cazul în care nu există o analiză a imaginilor, dacă bancul de lucru este sterilizat înainte de adăugarea plantelor în vasele de testare, se poate utiliza, de asemenea, o riglă sterilă pentru a măsura lungimea lăstarului principal la începutul și în timpul testului. Se înregistrează modificările în dezvoltarea plantei, de exemplu deformări ale lăstarilor, aspectul, indicațiile de necroză, cloroză sau pierderea de flotabilitate, precum și cele privind lungimea și aspectul rădăcinii. Se înregistrează, de asemenea, caracteristicile semnificative ale mediului de testare (de exemplu, prezența de material nedizolvat, creșterea de alge, ciuperci și bacterii în vasele de testare).

37. Pe lângă determinările lungimii lăstarului principal, se evaluează, de asemenea, efectele substanței chimice de testare asupra a trei (sau mai multe) dintre următoarele variabile de măsurare:

- i. Lungimea totală a ramurilor laterale
- ii. Lungimea totală a lăstarilor
- iii. Lungimea totală a rădăcinii
- iv. Greutatea în stare proaspătă
- v. Greutate uscată
- vi. Numărul de vârtejuri

Nota 1: Observațiile făcute în timpul testului de stabilire a intervalului pot contribui la selectarea măsurătorilor suplimentare relevante dintre cele șase variabile enumerate mai sus.

Nota 2: Se recomandă determinarea greutateții în stare proaspătă și a greutateții uscate (parametri iv și v).

Nota 3: Datorită faptului că zaharoza și lumina (expunerea rădăcinilor la lumină în timpul testului) ar putea să influențeze transportatorii de auxină (hormon de creștere a plantelor) și că unele substanțe chimice ar putea să aibă un mod de acțiune de tipul auxinei, incluziunea punctelor finale legate de rădăcină (parametrul iii) este discutabilă.

Nota 4: Rezultatele testului circular arată coeficienți mari de variație (> 60 %) pentru lungimea totală a ramurilor laterale (parametrul i). Lungimea totală a ramurilor laterale este cuprinsă în orice caz în măsurarea lungimii totale a lăstarilor (parametrul ii) care prezintă coeficienți de variație mai acceptabili de < 30 %.

Nota 5: Pe baza considerațiilor de mai sus, principalele puncte finale de măsurare recomandate sunt: lungimea totală a lăstarilor, greutatea în stare proaspătă și greutatea uscată (parametrii ii, iv și v); parametrul vi – numărul vârtejurilor – va fi stabilit de cel care efectuează testul.

38. Lungimea lăstarului principal și numărul de vârtejuri prezintă un avantaj în sensul că pot fi determinate pentru fiecare vas de testare și de control la începutul, în timpul și la sfârșitul testului pe baza analizei fotografiilor și a imaginilor, deși se poate folosi, de asemenea, o riglă (sterilă).

39. Lungimea totală a ramurilor, lungimea totală a rădăcinilor (ca sumă a tuturor ramurilor laterale și a rădăcinilor) și lungimea totală a lăstarilor (ca sumă a lungimii lăstarului principal și a lungimii totale a ramurilor laterale) pot fi măsurate cu o riglă la sfârșitul expunerii.

40. Greutatea în stare proaspătă și/sau greutatea uscată trebuie determinate la începutul testului pe baza unui eșantion din precultură reprezentativ pentru substanța folosită la începutul testului, iar la sfârșitul testului, utilizând materialul vegetal din fiecare vas de testare și de control.

41. Lungimea totală a ramurilor laterale, lungimea totală a lăstarilor, lungimea totală a rădăcinii, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată și numărul vârtejurilor pot fi determinate după cum urmează:

- i. Lungimea totală a ramurilor laterale: Lungimea ramurilor laterale poate fi determinată prin măsurarea tuturor ramurilor laterale cu o riglă la sfârșitul perioadei de expunere. Lungimea totală a ramurilor laterale reprezintă suma tuturor ramurilor laterale din fiecare vas de testare și de control.
- ii. Lungimea totală a lăstarilor: Lungimea lăstarului principal poate fi determinată prin analiza imaginilor sau folosind o riglă. Lungimea totală a lăstarilor reprezintă suma lungimii totale a ramurilor laterale și a lungimii lăstarului principal din fiecare vas de testare și de control la sfârșitul perioadei de expunere.

- iii. Lungimea totală a rădăcinii: Lungimea rădăcinii poate fi determinată prin măsurarea tuturor rădăcinilor cu ajutorul unei rigle la sfârșitul perioadei de expunere. Lungimea totală a rădăcinii este suma tuturor rădăcinilor din fiecare vas de testare și de control.
- iv. Greutatea în stare proaspătă: Greutatea în stare proaspătă poate fi determinată prin cântărirea organismelor de testare la sfârșitul perioadei de expunere. Toate materiale vegetale din fiecare vas de testare și de control vor fi spălate cu apă distilată și uscate ușor cu hârtie din celuloză. După această măsură preliminară, greutatea în stare proaspătă se va determina prin cântărire. Biomasa de la începutul testului (greutate în stare proaspătă) se determină pe baza unui eșantion din organisme de testare luate din același lot folosit pentru inocularea vaselor de testare.
- v. Greutatea uscată: După efectuarea pregătirilor pentru determinarea greutateii în stare proaspătă, organisme de testare se usucă la 60 °C până la o greutate constantă. Această masă reprezintă greutatea uscată. Biomasa de la începutul testului (greutatea uscată) este determinată pe baza unui eșantion din organisme de testare din același lot folosit pentru inocularea vaselor de testare.
- vi. Numărul vârteturilor: Vor fi numărate toate vârteturile de-a lungul lăstarului principal.

Frecvența măsurărilor și determinărilor analitice

- 42. Dacă se folosește un concept de test static, pH-ul fiecărui tratament se măsoară la începutul și la sfârșitul testului. Dacă se folosește un concept de test semistatic, pH-ul se măsoară în fiecare lot de soluție de testare „proaspătă” înainte de fiecare reînnoire, precum și în soluțiile „uzate” corespunzătoare.
- 43. Intensitatea luminii se măsoară în încăperea, incubatorul sau camera de creștere în puncte aflate la aceeași distanță de sursa de lumină ca și organisme de testare. Măsurătorile se fac cel puțin o dată în timpul testului. Temperatura mediului într-un vas înlocuitor menținut în condiții similare cu cele din încăperea, incubatorul sau camera de creștere se înregistrează cel puțin o dată pe zi (sau în mod continuu cu un înregistrator de date).
- 44. În timpul testului, concentrațiile substanței/substanțelor chimice de testare sunt determinate la intervale de timp adecvate. În testele statice, cerința minimă este de a determina concentrațiile la începutul și la sfârșitul testului.
- 45. În testele semistatice, în care nu se estimează menținerea concentrației substanței (substanțelor) chimice de testare în limita a $\pm 20\%$ din cea nominală, este necesar să se analizeze toate soluțiile de testare proaspăt preparate, precum și aceleași soluții la fiecare reînnoire. Cu toate acestea, pentru testele în care concentrațiile inițiale măsurate ale substanței (substanțelor) chimice de testare nu se situează în limita a $\pm 20\%$ din cea nominală, dar unde se pot aduce dovezi suficiente care să indice repetabilitatea și stabilitatea concentrațiilor inițiale (și anume, în intervalul de 80-120 % din concentrațiile inițiale), determinările chimice se vor efectua doar la concentrațiile de testare cele mai mari și cele mai scăzute. În toate cazurile, determinarea concentrațiilor substanței chimice de testare trebuie efectuată doar în unul dintre vasele conținând probe duplicate la fiecare concentrație de testare (sau în conținutul vaselor grupate în funcție de proba duplicat).
- 46. Dacă se poate dovedi menținerea satisfăcătoare, pe toată durata testului, a concentrației substanței chimice de testare în limita a $\pm 20\%$ din cea nominală sau măsurată inițial, atunci analiza rezultatelor poate avea loc pe baza valorilor nominale sau măsurate inițial. Dacă abaterea de la concentrația nominală sau măsurată inițial nu se află în limita a $\pm 20\%$, este necesar ca analiza rezultatelor să se bazeze pe media geometrică a concentrației în timpul expunerii sau pe modelele care descriu declinul concentrației substanței chimice de testare. (5)

Test la valori-limită

- 47. În anumite circumstanțe, de exemplu atunci când un test preliminar arată că substanța de testare nu are efecte toxice la concentrații de până la 100 mg/l sau până la limita sa de solubilitate în mediul de testare sau în cazul unei formulări până la limita sa de dispersie, se poate efectua un test la valori-limită care presupune o comparație a răspunsurilor unui grup de control și ale unui grup supus tratamentului (100 mg/l sau o concentrație egală cu limita solubilității). Se recomandă ca acest test să fie confirmat prin analiza concentrației de expunere. Pentru un test la valori-limită se aplică toate condițiile de testare și criteriile de validitate descrise anterior, cu excepția faptului că numărul de probe duplicate supuse tratamentului trebuie să fie dublu. Creșterea în grupul de control și în cel supus tratamentului poate fi analizată folosind un test statistic pentru a compara mediile, de exemplu un test-t Student.

DATE ȘI RAPORTARE

Variable de răspuns

48. Scopul testului este de a determina efectele substanței chimice de testare asupra creșterii vegetative a *Myriophyllum spicatum*. Această metodă de testare descrie două variabile de răspuns.
- a) Viteza medie specifică de creștere: Această variabilă de răspuns este calculată pe baza schimbărilor logaritmice ale lungimii lăstarului principal și, în plus, pe baza schimbărilor logaritmice ale altor parametri de măsurare, și anume lungimea totală a lăstarilor, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată sau numărul vârtejurilor în timp (exprimată pe zi) în probele de control și în fiecare grup supus tratamentului. Notă: Pentru parametrul de măsurare exprimat de lungimea totală a ramurilor laterale și lungimea totală a rădăcinii, nu este posibilă calcularea vitezei medii specifice de creștere. La începutul testului, organismul de testare nu are ramuri laterale și nici rădăcini (bazate pe pregătirea din precultură); începând cu valoarea zero, calcularea vitezei medii specifice de creștere nu este definită.
- b) Randament: Această variabilă de răspuns se calculează pe baza schimbărilor survenite în lungimea lăstarului principal și, în plus, pe baza schimbărilor survenite la alți parametri de măsurare – și anume, de preferință lungimea totală a lăstarilor, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată sau numărul vârtejurilor, precum și la alți parametri dacă se consideră util – în probele de control și în fiecare grup de tratament până la sfârșitul testului.
49. Estimările de toxicitate trebuie să se bazeze pe lungimea lăstarului principal și alte trei variabile de măsurare (de exemplu, de preferință lungimea totală a lăstarilor, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată, greutatea în stare proaspătă sau numărul de vârtejuri, a se vedea punctul 37 și notele 2, 4 și 5 la prezentul punct), întrucât unele substanțe chimice pot afecta alte variabile de măsurare considerabil mai mult decât lungimea lăstarului principal. Acest efect nu va putea fi detectat exclusiv în urma calculării lungimii lăstarului principal.

Viteza medie specifică de creștere

50. Viteza medie specifică de creștere pentru o anumită perioadă se calculează ca fiind creșterea logaritmică a variabilelor de creștere – lungimea lăstarului principal și trei variabile suplimentare de măsurare (lungimea totală a lăstarilor, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată și numărul de vârtejuri) – folosind formula de mai jos pentru fiecare probă duplicat a probelor de control și a probelor supuse tratamentului:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

unde:

μ_{i-j} : viteza medie specifică de creștere de la momentul i la momentul j

N_i : variabila de măsurare în vasul de testare sau de control la momentul i

N_j : variabila de măsurare în vasul de testare sau de control la momentul j

t: perioada de timp de la i la j

Pentru fiecare grup supus tratamentului și de control, se calculează o valoare medie a vitezei de creștere în paralel cu estimările varianței.

51. Viteza medie specifică de creștere se calculează pentru întreaga durată a testului (momentul „i” în formula de mai sus este începutul testului, iar momentul „j” este sfârșitul testului). Pentru fiecare concentrație de testare și probă de control, se calculează o valoare medie pentru viteza medie specifică de creștere în paralel cu estimările varianței. În plus, viteza de creștere pe secțiuni se evaluează în scopul evaluării efectelor substanței chimice de testare care se produc în timpul perioadei de expunere (de exemplu, prin verificarea curbilor de creștere transformate logaritmice).

52. Astfel, procentajul de inhibare a vitezei de creștere (I_r) se poate calcula pentru fiecare concentrație de testare (grup supus tratamentului) conform următoarei formule:

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100$$

unde:

% I_r : procentajul de inhibare a vitezei medii specifice de creștere

μ_c : valoarea medie a μ în grupul de control

μ_T : valoarea medie a μ în grupul supus tratamentului

Randamentul

53. Efectele asupra randamentului se determină pe baza variabilei de măsurare, și anume lungimea lăstarului principal și a altor trei variabile suplimentare de măsurare (de preferință lungimea totală a lăstarilor, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată sau numărul de vârtejuri) prezente în fiecare vas de testare la începutul și la sfârșitul testului. În cazul greutatei în stare proaspătă sau al greutatei uscate, biomasa inițială se determină pe baza unui eșantion din organismele de testare prelevat din același lot folosit pentru inocularea vaselor de testare. Pentru fiecare concentrație de testare și probă de control, se calculează o valoare medie a randamentului în paralel cu estimările varianței. Procentajul mediu de inhibare a randamentului (% I_y) poate fi calculat pentru fiecare grup supus tratamentului după cum urmează:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

unde:

% I_y : procentajul de reducere a randamentului

b_c : biomasa finală minus biomasa inițială pentru grupul de control

b_T : biomasa finală minus biomasa inițială în grupul supus tratamentului

Timp de duplicare

54. Pentru a determina timpul de duplicare (T_d) al lungimii lăstarului principal și aderarea la acest criteriu de validitate (a se vedea punctul 8), se folosește următoarea formulă cu date obținute din vasele de control:

$$T_d = \ln 2 / \mu$$

Unde μ este viteza medie specifică de creștere, astfel cum a fost descrisă la punctele 50-52.

Reprezentarea grafică a curbelor concentrație-răspuns

55. Se reprezintă grafic curbele concentrație-răspuns care fac legătura între media procentajului de inhibare a variabilei de răspuns (I_r sau I_y calculată conform descrierii de la punctul 53) și logaritmul concentrației substanței chimice de testare.

Estimarea EC_x

56. Estimările EC_x trebuie să se bazeze atât pe viteza medie specifică de creștere ($E_c C_x$), cât și pe randament ($E_y C_x$), fiecare dintre acestea trebuind să se bazeze pe lungimea lăstarului principal și posibil pe variabile suplimentare de măsurare (de preferință lungimea totală a lăstarilor, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată sau numărul de vârtejuri). Aceasta se justifică deoarece există substanțe chimice care au un impact diferit asupra lungimii lăstarului principal și asupra altor variabile de măsurare. Parametrii de toxicitate doriți sunt, prin urmare, patru valori de EC_x pentru fiecare nivel de inhibare x calculat: $E_c C_x$ (lungimea lăstarului principal); $E_c C_x$ (de preferință lungimea totală a lăstarilor, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată sau numărul de vârtejuri); $E_y C_x$ (lungimea lăstarului principal); și $E_y C_x$ (de preferință lungimea lăstarului principal, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată, numărul de vârtejuri).

57. Se va nota că valorile EC_x calculate folosind cele două variabile de răspuns nu sunt comparabile, iar această diferență este recunoscută atunci când se folosesc rezultatele testului. Valorile EC_x bazate pe viteza medie specifică de creștere (E_rC_x) vor fi în cele mai multe cazuri mai mari decât rezultatele bazate pe randament (E_yC_x) – în cazul în care se aderă la condițiile de testare ale prezentei metode de testare – datorită bazei matematice a abordărilor respective. Această diferență nu se va interpreta ca o diferență de sensibilitate între cele două variabile de răspuns, valorile fiind diferite din punct de vedere matematic.

Proceduri statistice

58. Obiectivul este de a se obține o relație cantitativă concentrație-răspuns prin analiza regresiei. Este posibilă folosirea unei regresii liniare ponderate după ce s-a efectuat o transformare de liniarizare a datelor de răspuns, de exemplu în unități probit, logit sau Weibull (7), dar procedurile de regresie neliniară sunt tehnici preferate, care tratează mai bine inexactitățile inevitabile ale datelor și abaterile de la distribuțiile regulate. Atunci când se apropie de zero sau inhibiție totală, aceste inexactități se pot amplifica prin transformare, interferând cu analiza (7). Trebuie remarcat că metodele standard de analiză folosind transformările probit, logit sau Weibull se folosesc în cazul datelor binare (de exemplu, date despre mortalitate sau supraviețuire) și trebuie să fie modificate pentru a reflecta datele privind viteza de creștere și randamentul. Procedurile specifice pentru determinarea valorilor EC_x pe baza datelor continue se regăsesc în referințele (8) (9) (10).
59. Pentru fiecare variabilă de răspuns de analizat se utilizează relația concentrație-răspuns pentru calcularea estimărilor punctuale ale valorilor EC_x . Dacă este posibil, se determină limitele de încredere de 95 % pentru fiecare estimare. Concordanța datelor de răspuns cu modelul de regresie se evaluează în mod grafic sau statistic. Analiza regresiei se efectuează folosind răspunsuri individuale ale probelor duplicate, nu medii ale grupului supuse tratamentului.
60. Estimările și limitele de încredere ale EC_{50} pot fi obținute, de asemenea, folosind interpolarea liniară cu „bootstrap” (10), dacă modelele/metodele de regresie disponibile sunt inadecvate pentru date.
61. Pentru estimarea LOEC și, prin urmare, a NOEC, este necesară compararea mediilor de tratare folosind tehnici de analiză a varianței (ANOVA). Media pentru fiecare concentrație se compară ulterior cu media probei de control folosind o metodă de comparare multiplă adecvată sau de testare a tendinței. Testul lui Dunnett sau testul lui Williams pot fi utile în acest sens (12) (13) (14) (15) (16). Este necesar să se evalueze dacă ipoteza ANOVA de omogenitate a varianței se verifică. O astfel de evaluare se poate efectua grafic sau printr-un test formal (15). Teste adecvate sunt cele ale lui Levene sau Bartlett. Neîndeplinirea ipotezei de omogenitate a varianțelor poate fi corectată uneori prin transformarea logaritmică a datelor. Dacă eterogenitatea varianței este extremă și nu poate fi corectată prin transformare, se va lua în considerare analizarea prin metode precum testele Jonkheere regresive de stabilire a tendinței. Îndrumări suplimentare privind determinarea NOEC sunt prezentate în referința (10).
62. Progresele științifice recente au condus la recomandarea de a renunța la conceptul de NOEC și de a-l înlocui cu estimări punctuale ale EC_x bazate pe regresie. Nu a fost stabilită o valoare adecvată a x pentru acest test cu *Myriophyllum*. Cu toate acestea, un interval de 10-20 % pare a fi adecvat (în funcție de variabilele de răspuns alese) și, de preferat, se raportează atât EC_{10} , și EC_{20} , cât și limitele lor de încredere.

Raportare

63. Raportul de testare include următoarele:

Substanța chimică testată

Substanță mono-constituent:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— datele de identificare chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților, după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc. (inclusiv conținutul în carbon organic, dacă este necesar).

Substanțe multi-constituent, UVCB sau amestecuri:

- în măsura în care este posibil, caracterizate prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), numărul aparițiilor și proprietățile fizico-chimice relevante ale constituenților.

Specia de testare:

- Denumire științifică și sursa.

Condițiile de testare

- Procedura de testare folosită (statică sau semistatică).
- Data de începere a testului și durata acestuia.
- Mediul de testare.
- Descrierea conceptului experimental: vasele de testare și capacele, volumele soluțiilor, lungimea lăstarului principal per vas de testare la începutul testului.
- Concentrațiile de testare (nominale și măsurate corespunzător) și numărul de duplicate per concentrație.
- Metodele de preparare a soluțiilor stoc și a soluțiilor de testare, inclusiv folosirea oricărui solvent sau agent de dispersie.
- Temperatura în timpul testului.
- Sursa de lumină, intensitatea luminii și omogenitatea.
- Valorile pH-ului mediilor de testare și de control.
- Metoda de analiză a substanței chimice de testare cu date adecvate de evaluare a calității (studii de validare, deviații standard sau limite de încredere ale analizelor).
- Metode de determinare a lungimii medii a lăstarilor și a altor variabile de măsurare, de exemplu lungimea totală a ramurilor laterale, lungimea totală a lăstarilor, lungimea totală a rădăcinii, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată sau numărul de vârtejuri.
- Starea culturii (sterilă sau nesterilă) din fiecare vas de testare și de control, cu ocazia fiecărei observări.
- Orice abatere de la această metodă de testare.

Rezultate

- Date brute: lungimea lăstarului principal și alte variabile de măsurare în fiecare vas de testare și de control cu ocazia fiecărei observații și cu ocazia analizei.
- Media și abaterile standard pentru fiecare variabilă de măsurare.
- Curbele de creștere pentru fiecare variabilă de măsurare.
- Variabilele de răspuns calculate pentru fiecare probă duplicat supusă tratamentului, cu valori medii și coeficient de variație pentru probele duplicat.
- Reprezentarea grafică a relației concentrație/efect.
- Estimări ale punctelor finale toxice pentru variabilele de răspuns, de exemplu EC_{50} , EC_{10} , EC_{20} și intervalele de încredere aferente. Dacă au fost calculate, LOEC și/sau NOEC și metodele statistice folosite pentru determinarea acestora.
- Dacă s-a folosit ANOVA, dimensiunea efectului care poate fi detectat (de exemplu, diferența cea mai puțin semnificativă);
- Orice stimulare a creșterii constatată în cazul oricărui tratament;
- Orice indicii vizuale de fitotoxicitate, precum și observările soluțiilor de testare;
- Discutarea rezultatelor, inclusiv orice influență asupra rezultatului testului rezultată din abaterile de la această metodă de testare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.
 - (2) Maletzki, D. et al. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch*, No. 22, pp. 702–710.
 - (3) Capitolul C.26 din prezenta anexă: *Lemna* sp., test de inhibare a creșterii.
 - (4) OECD (2014), „*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.
 - (5) OECD (2000), „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.
 - (6) Capitolul C.51 din prezenta anexă: Test de toxicitate asupra *Myriophyllum spicatum* într-un sistem apă-sediment.
 - (7) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.
 - (8) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/2, pp. 157-167.
 - (9) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.
 - (10) OECD (2006), „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.
 - (11) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.
 - (12) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.
 - (13) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.
 - (14) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.
 - (15) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.
 - (16) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.
-

Apendicele 1

DEFINIȚII

Biomasă înseamnă greutatea uscată a materiei vii prezente într-o populație. În acest test, biomasa este suma lăstarului principal, a tuturor ramurilor laterale și a tuturor rădăcinilor.

Substanță chimică înseamnă o substanță sau un amestec.

Cloroză înseamnă schimbarea culorii de la verde la galben a organismului de testare, în special a vârtejurilor.

EC_x înseamnă concentrația substanței chimice de testare dizolvate în mediul de testare din care rezultă o reducere de x % (de exemplu, 50 %) a creșterii *Myriophyllum spicatum* într-o anumită perioadă de expunere (care se menționează explicit în cazul în care există abateri de la durată completă sau normală a testului). Pentru a reprezenta în mod clar o valoare EC derivată din viteza de creștere sau randament, se folosesc simbolurile „E_xC” pentru viteza de creștere, respectiv „E_yC” pentru randament, urmate de variabila de măsurare folosită, de exemplu E_rC (lungimea lăstarului principal).

Creștere înseamnă o mărire a variabilei de măsurare, cum ar fi lungimea lăstarului principal, lungimea totală a ramurilor laterale, lungimea totală a lăstarilor, lungimea totală a rădăcinii, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată sau numărul de vârtejuri, în perioada de testare.

Viteză de creștere (viteza medie specifică de creștere) înseamnă creșterea logaritmică a biomasei în timpul perioadei de expunere. *Notă:* Variabile de răspuns legate de viteza de creștere sunt independente de durată testului atât timp cât tendința de creștere a organismelor de control neexpuse este exponențială.

Concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) înseamnă cea mai scăzută concentrație testată la care se observă că substanța chimică are un efect de reducere semnificativ din punct de vedere statistic asupra creșterii (la $p < 0,05$) în comparație cu proba de control, într-un anumit timp de expunere. Toate concentrațiile testate mai mari decât LOEC trebuie să aibă totuși un efect nociv egal sau mai mare decât cel observat la LOEC. Atunci când cele două condiții menționate nu pot fi satisfăcute, trebuie furnizată o explicație completă a modului de alegere a LOEC (și, prin urmare, NOEC).

Variabile de măsurare înseamnă orice tip de variabilă care se măsoară pentru a exprima punctul final de testare prin folosirea uneia sau mai multor variabile de răspuns diferite. În cadrul acestei metode, lungimea lăstarului principal, lungimea totală a ramurilor laterale, lungimea totală a lăstarilor, lungimea totală a rădăcinii, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată și numărul vârtejurilor sunt variabile de măsurare.

Monocultură este o cultură cu o singură specie de plante.

Necroză înseamnă țesut mort (și anume, alb sau maro închis) al organismului de testare.

Concentrație la care nu se observă niciun efect (NOEC) înseamnă concentrația de testare situată imediat sub LOEC.

Variabilă de răspuns înseamnă orice variabilă pentru estimarea toxicității derivate din orice variabilă măsurată care descrie biomasa prin diferite metode de calcul. Pentru această metodă de testare, viteza de creștere și randamentul sunt variabile de răspuns derivate din variabile de măsurare precum lungimea lăstarului principal, lungimea totală a lăstarilor, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată sau numărul de vârtejuri.

Test (de reînnoire) semistatic înseamnă un test în care soluția de testare se înlocuiește periodic, la intervale specifice pe durată testului.

Test static înseamnă o metodă de testare care nu presupune reînnoirea soluției de testare pe durată testului.

Substanță chimică de testare înseamnă orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

Punctul final de testare descrie factorul general care va fi modificat de substanța chimică de testare în comparație cu proba de control, acesta fiind obiectivul testului. În această metodă de testare, punctul final de testare este inhibarea creșterii, care poate fi exprimată prin diferite variabile de răspuns bazate pe una sau mai multe variabile de măsurare.

Mediu de testare înseamnă mediul de cultură sintetic complet în care plantele testate cresc atunci când sunt expuse la substanța chimică de testare. În mod normal, substanța chimică de testare va fi dizolvată în mediul de testare.

UVCB este o substanță cu compoziție necunoscută sau variabilă, un produs de reacție complex sau un material biologic.

Randament înseamnă valoarea unei variabile de măsurare pentru exprimarea biomasei la sfârșitul perioadei de expunere minus variabila de măsurare la începutul perioadei de expunere. Notă: În cazul în care tendința de creștere a organismelor de testare neexpuse este exponențială, variabilele de răspuns bazate pe randament vor descrește cu durata testului.

Apendicele 2

MEDIU ANDREWS MODIFICAT PENTRU CULTURA ȘI PRECULTURA STOC

Din cinci soluții stoc de nutrienți preparate separat modificate, va fi pregătit mediul Andrews modificat necesar pentru cultura și precultura stoc, cu un adaos de 3 % zaharoză.

Tabelul 1

Compoziția soluției nutritive Andrews: (Desemnare ASTM E 1913-04)

Producția de soluții stoc nutritive			Producția de soluție nutritivă
Soluție stoc	Substanță chimică	Greutate inițială per 1000 ml	ml per 5 l soluție nutritivă
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO ₃	8,08 g	
	Ca(NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O	18,88 g	
2	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	9,86 g	50
3	A se vedea mai jos soluție stoc 3.1		50
4	KH ₂ PO ₄	2,72 g	50
5	FeSO ₄ × 7 H ₂ O	0,278 g	50
	Na ₂ EDTA × 2 H ₂ O	0,372 g	

Soluțiile stoc pot fi păstrate în frigider timp de 6 luni (la o temperatură de 5-10 °C). Numai soluția stoc 5 are o valabilitate redusă (două luni).

Tabelul 2

Producția de soluție stoc 3.1 pentru prepararea soluției stoc 3

Substanța chimică	Greutatea inițială g/100 ml
MnSO ₄ × 4 H ₂ O	0,223
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,115
H ₃ BO ₃	0,155
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,0125
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4 H ₂ O	0,0037

După prepararea soluției stoc 3.1 (tabelul 2), soluția se congelează în aproximativ 11 mlalicate (la cel puțin – 18° C). Porțiile congelate au o perioadă de valabilitate de cinci ani.

Pentru a produce o soluție stoc 3, se decongelează soluția stoc 3.1, se pun 10 ml din aceasta într-un flacon volumetric și se adaugă apă ultrapură până la semnul de pe flacon.

Pentru a obține un mediu modificat Andrews, se umple un flacon volumetric de 5 ml cu aproximativ 2 500 ml. După adăugarea a 50 ml din fiecare soluție stoc, se umple 90 % din flaconul gradat cu apă ultrapură și se setează pH-ul la 5.8.

Se adaugă apoi 150 g zaharoză dizolvată (3 % per 5 l); ulterior, se umple flaconul volumetric cu apă ultrapură până la semn. În cele din urmă, soluția nutritivă se toarnă în flacoane Schott de 1 l și se bagă la autoclavă la 121 °C timp de 20 de minute.

Soluția nutritivă astfel produsă poate fi păstrată sterilă la frigider (la 5-10 °C) timp de trei luni.

Mediu Andrews modificat pentru testul de toxicitate fără sediment

Din cele cinci soluții stoc nutritive deja menționate în tabelele 1 și 2, se prepară un mediu Andrews modificat, concentrat de zece ori în vederea obținerii soluțiilor de testare, cu adaos de 30 % zaharoză. În acest scop, se toarnă aproximativ 100 ml de apă ultrapură într-un flacon volumetric de 1 l. După adăugarea a 100 ml din fiecare soluție stoc, se setează pH-ul la 5,8. Se adaugă apoi 30 % zaharoză dizolvată (300 gr per 1 000 ml); ulterior, se umple flaconul volumetric cu apă ultrapură până la semn.

În cele din urmă, soluția nutritivă se pune în flacoane Schott de 0,5 l și se bagă la autoclavă la 121 °C timp de 20 de minute.

Soluția nutritivă modificată și concentrată de zece ori astfel produsă poate fi păstrată în condiții sterile la frigider (la 5-10 °C) timp de trei luni.

Apendicele 3

MENȚINEREA CULTURII STOC

În prezentul apendice 3 este descrisă cultura stoc de *Myriophyllum spicatum* L ⁽¹⁾, o plantă acvatică dicotiledonată submersă din familia peniței. Între lunile iunie și august, flori discrete roz-albe își fac apariția la suprafața apei. Plantele sunt înrădăcinate în sol prin intermediul unui sistem robust de rizomi și pot fi găsite în întreaga emisferă nordică, în apele stătătoare eutrofice dar totuși nepoluate și mai bogate în calciu cu substrat noroios. *Myriophyllum spicatum* preferă apa dulce, dar se găsește și în apă salmastră.

Pentru a obține o cultură stoc fără sediment în condiții de laborator, sunt necesare plante sterile. Plantele sterile pot fi procurate de la laboratorul german Umweltbundesamt (Agenția Federală de Mediu din Germania).

În mod alternativ, organismele de testare pot fi preparate pornind de la plante nesterile în conformitate cu denumirea ASTM E 1913-04. A se vedea mai jos – extras din Ghidul Standard ASTM – procedura de cultivare a *Myriophyllum sibiricum* colectată de pe teren:

„Dacă se începe cu plante colectate de pe teren, nesterile, rădăcinile tuberoase de *M.sibiricum* se colectează toamna. Se așază rădăcinile tuberoase într-un acvariu de 20 l conținând 5 cm de sediment steril acoperit cu nisip pe bază de siliciu sau de exemplu de Turface® și 18 l de apă reactivă. Se aerează acvariul și se menține la o temperatură de 15 °C și o densitate între 200 și 300 μmol m⁻² s⁻¹ pentru 16 ore pe zi. Cultura plantelor în acvariu poate fi menținută ca o sursă de rezervă de plante în cazul în care culturile de plante sterile sunt distruse din cauza unei defecțiuni mecanice în dulapul de creștere, a contaminării sau din alte motive. Plantele cultivate în acvariu nu sunt sterile, iar culturile sterile nu pot fi menținute într-un sistem cu loturi de cultură. Pentru a steriliza cultura, plantele de acvariu sunt eliminate din acvarii și clătite sub flux de apă deionizată timp de aproximativ 0,5 ore. În condiții aseptice într-un dulap cu flux de aer laminar, plantele sunt dezinfectate mai puțin de 20 de minute (până ce partea cea mai mare a țesutului vegetal este albită și doar vârful aflat în creștere rămâne verde) într-o soluție de hipoclorit de sodiu 3 % (g/v) care conține 0,01 % dintr-un agent tensioactiv de suprafață adecvat. Se agită dezinfectantul și materialul vegetal. Segmentele cu mai multe noduri sunt transferate în tuburi sterile de cultură care conțin 45 ml de mediu Andrews modificat și sterilizat și acoperite cu închideri plane pentru tuburi de cultură. În fiecare cameră de testare se pune un singur segment vegetal. Pentru a asigura închiderea vasului de cultură, se folosește film de laborator de etanșare. Odată ce s-a stabilit o cultură sterilă, segmentele de plante care conțin mai multe noduri trebui transferate în camere noi de testare care conține un mediu nutritiv lichid proaspăt la fiecare zece până la douăsprezece zile. Astfel cum s-a demonstrat prin cultura pe plăci cu geloză, plantele trebuie să fie sterile și să rămână sterile timp de opt săptămâni înainte de începerea testului.”

Întrucât mediul Andrews modificat conține zaharoză (mediu care stimulează creșterea ciupercilor și a bacteriilor), toate materialele, soluțiile și culturile se efectuează în condiții sterile. Toate lichidele, precum și echipamentele sunt sterilizate înainte de utilizare. Sterilizarea se realizează prin tratarea cu aer cald (210 °C) timp de 4 ore sau la autoclavă timp de 20 minute la 121 °C. În plus, toate flacoanele, vasele, bolurile etc. și alte echipamente sunt supuse tratamentului la flacăra pe un banc de lucru steril chiar înainte de utilizare.

Culturile stoc pot fi menținute în condiții de temperatură și iluminare reduse (50 μE m⁻² s⁻¹, 20 ± 2 °C) pentru perioade mai îndelungate fără a fi nevoie să fie restabilite. Mediul de creștere pentru *Myriophyllum* trebuie să fie același cu mediul folosit pentru testare, dar pentru culturile stoc se poate folosi orice alt mediu bogat în nutrienți.

Segmentele vegetale sunt distribuite în mod axenic în mai multe flacoane Erlenmeyer de 500 ml și/sau Fernbach de 2 000 ml, fiecare umplut cu aproximativ 450 respectiv 1 000 ml de mediu Andrews modificat. Ulterior, flacoanele sunt acoperite în condiții axenice cu dopuri de celuloză.

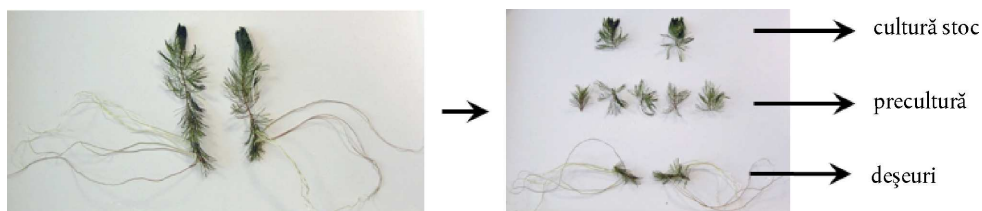
În plus, este absolut necesar un tratament amănunțit cu flacăra al echipamentului la un banc de lucru steril înainte de utilizare. În funcție de număr și de dimensiune, plantele urmează să fie transferate în soluție nutritivă proaspătă la intervale de aproximativ trei săptămâni.

Pentru această cultură reinnoită se pot folosi vârfurile, precum și segmente din partea centrală a tulpinii. Numărul și dimensiunea plantelor transferate (sau segmente de plante) depind de cât de multe plante sunt necesare. De exemplu, se pot transfera cinci segmente de lăstar într-un flacon Fernbach și trei segmente de lăstar într-un flacon Erlenmeyer, fiecare cu o lungime de 5 cm. Se înlătură orice parte cu rădăcini, cu floare, moartă sau care se remarcă în alt fel.

(¹) Carl von Linné (* May, 23th, 1707 in Råshult /Älmhult; † January, 10th, 1778 in Uppsala).

Figura 1

Tăierea plantelor pentru cultura stoc și precultură după 3 săptămâni de la cultivare.



Cultura plantelor trebuie să fie realizată în flacoane Erlenmayer de 500 ml și Fernbach de 2 000 ml într-un incubator de răcire la 20 ± 2 °C cu o lumină continuă la aproximativ $100150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sau 6 000-9 000 lux (emisă de iluminarea camerei cu temperatură de culoare „lumină albă caldă”).

Figura 2

Cultura plantelor într-un incubator de răcire cu iluminare.



Se folosesc vase de cultură din sticlă curate din punct de vedere chimic (curățate cu acid) și sterile, precum și tehnici de manipulare aseptică. În eventualitatea contaminării culturii stoc, de exemplu cu alge, ciuperci și/sau bacterii, se va prepara o cultură nouă sau se va reînnoi cultura cu o cultură stoc de la un alt laborator.

Apendicele 4

ÎNȚREȚINEREA PRECULTURII ȘI PREGĂTIREA ORGANISMULUI DE TESTARE PENTRU TESTARE

Pentru a obține o precultură, se taie lăstarii din cultura stoc în segmente cu câte două vârtejuri fiecare; se pun segmentele în flacoane Fernbach umplute cu mediu Andrews modificat (cu 3 % zaharoză). Fiecare flacon poate conține până la 50 de segmente de lăstar. Cu toate acestea, trebuie avut grijă ca segmentele să fie vitale și să nu aibă rădăcini și ramuri laterale sau muguri (a se vedea figura 1 din apendicele 3).

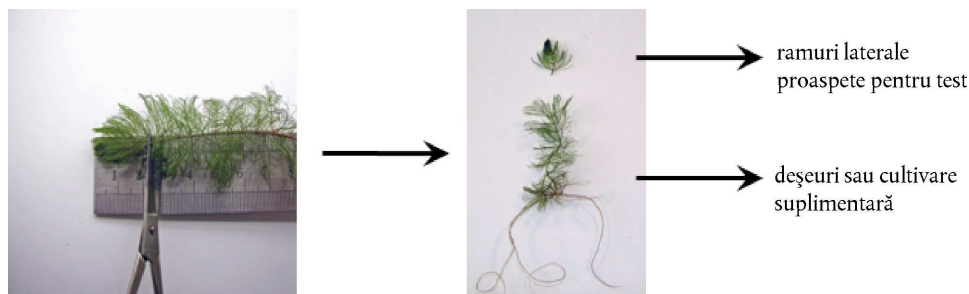
Organismele de precultură sunt cultivate timp de 14-21 de zile în condiții sterile într-o cameră cu condiții ambientale care alternează fazele de lumină/întuneric de 16/8 ore. Intensitatea luminii este selectată din intervalul de 100-150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Temperatura din vasele de testare trebuie să fie de 23 ± 2 °C.

Întrucât mediul modificat Andrews conține zaharoză (mediu care stimulează creșterea de alge, ciuperci și bacterii), prepararea substanțelor de testare și cultura trebuie efectuate în condiții sterile. Toate lichidele, precum și echipamentele sunt sterilizate înainte de utilizare. Sterilizarea se realizează prin tratarea cu aer încălzit (210 °C) timp de 4 ore sau la autoclavă timp de 20 de minute la 121 °C. În plus, toate flacoanele, vasele, bolurile etc. și alte echipamente sunt supuse tratamentului la flacăra la un banc de lucru steril chiar înainte de utilizare.

Lăstarii sunt înlăturați pe cale axenică din flacoanele de precultură, alegând un material cât se poate de omogen. Fiecare testare necesită cel puțin 60 de organisme de testare (testare cu opt concentrații chimice de testare). Pentru testare, se iau ramuri laterale proaspete din preculturi, se scurtează la 2,5 cm de la bază (măsurate cu rigla) și se transferă într-un pahar de laborator care conține un mediu Andrews modificat steril. Aceste ramuri laterale proaspete pot fi folosite pentru testul de toxicitate pe *Myriophyllum spicatum* într-un sistem fără sediment.

Figura 2

Tăierea plantelor din precultură pentru testul de toxicitate pe *Myriophyllum spicatum* într-un sistem fără sediment.



C.51 Test de toxicitate pe *Myriophyllum spicatum* într-un sistem apă-sediment**INTRODUCERE**

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 239 (2014). Metodele de testare sunt valabile pentru planta acvatică monocotiledonată plutitoare, specia *Lemna* (1) și pentru speciile de alge. Aceste metode sunt utilizate în mod obișnuit pentru a genera date care să permită evaluarea riscului substanțelor chimice de testare, în special celor cu activitate de erbicid, pentru speciile de plante acvatice nevizate. Cu toate acestea, în unele cazuri pot fi necesare date pentru specii macrofite suplimentare. Conform unui ghid recent publicat în urma unui atelier organizat de Societatea de Toxicologie și Chimie a Mediului (SETAC) pe tema Evaluării riscului pesticidelor asupra macrofitelor acvatice (AMRAP), datele privind speciile de macrofite rădăcinoase se pot dovedi necesare pentru substanțele chimice de testare atunci când se cunoaște faptul că *Lemna* și algele nu sunt sensibile la modul de acțiune sau în cazul în care partiția în sediment reprezintă o problemă, conducând la expunere prin absorbție radiculară (3). Pe baza cunoștințelor și a experienței actuale, plantele de *Myriophyllum* au fost selectate ca specie preferată în cazurile în care sunt necesare date privind o specie dicotiledonată rădăcinoasă submersă (4) (5) (6). Acest test nu înlocuiește alte teste de toxicitate acută; mai degrabă acesta ar trebui să le completeze astfel încât să fie posibilă o evaluare completă a riscului și pericolului pentru plantele acvatice. Metoda de testare pe *Myriophyllum spicatum* într-un sistem apă-sediment completează testul de toxicitate pe *Myriophyllum spicatum* într-un sistem fără sediment (7).
2. Prezentul document descrie o metodă de testare care permite evaluarea efectelor unei substanțe chimice asupra speciei de plante acvatice rădăcinoase *Myriophyllum spicatum*, care crește într-un sistem apă-sediment. Metoda de testare se bazează parțial pe metodele existente (1) (2) (8) și ia în considerare cercetările recente legate de evaluarea riscului pentru plantele acvatice (3). Metoda apă-sediment a fost validată de un test circular internațional efectuat cu specii de *Myriophyllum* crescute în condiții statice, care au fost expuse la substanța chimică de testare prin aplicări realizate prin coloana de apă (9). Cu toate acestea, sistemul de testare este ușor adaptat pentru a permite expunerea prin intermediul unui sediment îmbogățit sau expunerea prin intermediul fazei apoase în regim semistatic sau scenarii doză-impulsuri, deși aceste scenarii nu au fost supuse oficial testului circular. Suplimentar, metoda generală poate fi folosită pentru alte specii rădăcinoase submerse și înălțătoare, inclusiv alte specii de *Myriophyllum* (de exemplu, *Myriophyllum aquaticum*) și *Glyceria maxima* (10). Modificări ale condițiilor, conceptului și duratei testului pot fi necesare pentru specii alternative. În special, sunt necesare eforturi suplimentare pentru a defini proceduri adecvate pentru *Myriophyllum aquaticum*. Aceste opțiuni nu sunt prezentate în detaliu în cadrul prezentei metode de testare, care descrie abordarea standard pentru expunerea *Myriophyllum spicatum* într-un sistem static prin faza apoasă.
3. Această metodă de testare se aplică substanțelor pentru care metoda de testare a fost validată [a se vedea detalii în raportul testului circular (9)] sau formule sau amestecuri cunoscute. Un test pe *Myriophyllum* poate fi efectuat pentru a îndeplini o cerință de date de nivel 1 declanșată de o potențială partiționare a substanței chimice în sediment sau de aspecte privind modul de acțiune/selectivitate. De asemenea, un test de laborator pe *Myriophyllum* poate fi necesar ca parte a unei strategii de nivel superior de a aborda preocupări legate de riscul pentru plantele acvatice. Motivul specific pentru efectuarea unui test va determina calea de expunere (și anume, prin apă sau sediment). Înainte de utilizarea acestei metode pentru testarea unui amestec destinat unui scop de reglementare, trebuie să se examineze dacă și, în caz afirmativ, motivele pentru care aceasta poate oferi rezultate adecvate în acest scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

PRINCIPIUL TESTULUI

4. Scopul testului este de a evalua efectele substanțelor chimice asupra creșterii vegetative a plantelor de *Myriophyllum* care cresc în medii standardizate (apă, sediment și nutrienți). În acest scop, muguri de lăstari proveniți de la plante sănătoase, fără inflorescență se plantează în ghivece în sediment standardizat, artificial, căruia i se adaugă nutrienți pentru a asigura creșterea adecvată a plantei, iar apoi sunt menținuți în mediu Smart și Beko (apendicele 1). După o perioadă de stabilire necesară pentru a permite formarea rădăcinilor, plantele sunt expuse unei serii de concentrații de testare adăugate în coloana de apă. Ca alternativă, expunerea prin sediment poate fi simulată prin îmbogățirea sedimentului artificial cu substanța chimică de testare și transplantarea plantelor în acest sediment îmbogățit. În ambele cazuri, plantele sunt menținute ulterior în condiții de mediu controlat timp de 14 zile. Efectele asupra creșterii se determină pe baza evaluărilor cantitative privind lungimea lăstarilor, greutatea în stare proaspătă și greutatea uscată, precum și pe baza observațiilor calitative ale unor simptome precum necroza, cloroza sau deformări de creștere.

5. Pentru a cuantifica efectele substanței chimice, creșterea în soluțiile de testare este comparată cu creșterea plantelor de control, iar concentrația care produce o inhibare de x % a creșterii este determinată și exprimată ca EC_x ; „ x ” poate fi orice valoare care depinde de cerințele de reglementare, de exemplu EC_{10} , EC_{20} și EC_{50} . Trebuie remarcat că estimările valorilor EC_{10} și EC_{20} sunt fiabile și adecvate doar în cadrul testelor în care coeficienții de variație ai plantelor de control scad sub nivelul estimat al efectului, și anume coeficienții de variație trebuie să fie <20 % pentru estimarea precisă a unei EC_{20} .
6. Se vor determina atât viteza medie specifică de creștere (estimată în urma evaluărilor lungimii lăstarilor, a greutateii în stare proaspătă și a greutateii uscate) cât și randamentul (estimată pe baza creșterii lungimii lăstarilor, a greutateii în stare proaspătă și a greutateii uscate) la plantele tratate și netratate. Viteza specifică de creștere (r) și randamentul (y) sunt folosite prin urmare ca să determine $E_r C_x$ (de exemplu, $E_r C_{10}$, $E_r C_{20}$, $E_r C_{50}$) și, respectiv, $E_y C_x$ (de exemplu, $E_y C_{10}$, $E_y C_{20}$, $E_y C_{50}$).
7. În cazul în care este necesar, concentrația cea mai scăzută pentru care se observă un efect (LOEC) și concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC) se pot determina statistic pe baza estimărilor ratelor medii specifice de creștere și ale randamentului.

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTARE

8. Este necesar să se cunoască o metodă analitică cu sensibilitate specifică pentru cuantificarea substanței chimice în mediul de testare.
9. Informațiile despre substanța chimică de testare care se pot dovedi utile în stabilirea condițiilor de testare includ formula structurală, compoziția în cazul substanțelor multi-constituent, UVCB, amestecuri sau formule, puritatea, solubilitatea în apă, stabilitatea în apă și la lumină, constanta de disociere (pK_a), coeficientul de partiție octanol-apă (K_{ow}), dacă este disponibil coeficientul de partiție la sediment (K_d), presiunea vaporilor și biodegradabilitatea. Solubilitatea în apă și presiunea vaporilor pot fi folosite pentru a calcula constanta legii lui Henry, care va arăta dacă sunt posibile pierderi semnificative ale substanței chimice de testare în timpul perioadei de testare. În cazul în care sunt susceptibile pierderi ale substanțelor chimice de testare, acestea trebuie cuantificate, iar etapele ulterioare pentru a controla pierderile trebuie documentate. Dacă informațiile privind solubilitatea și stabilitatea substanței/substanțelor de testare sunt incerte, se recomandă ca aceste caracteristici să fie evaluate în condițiile de testare, și anume mediul de creștere, temperatura, regimul de iluminare care urmează a fi folosite pentru test. *Notă:* Atunci când se testează ierbicide cu efect de peroxidare dependente de lumină, iluminarea din laborator trebuie să conțină prezența echivalentă a luminii solare ultraviolete care se găsește în lumina solară naturală.
10. pH-ul se măsoară și se ajustează în mediul de testare, după caz. Controlul pH-ului mediului de testare este deosebit de important, de exemplu în cursul testării unor metale sau substanțe instabile din punct de vedere hidrolitic. Alte orientări privind testarea substanțelor cu proprietăți fizico-chimice care le fac dificil de testat sunt prezentate într-un document de orientare al OCDE (11).

VALIDITATEA TESTULUI

11. Pentru ca rezultatele testului să fie valabile, lungimea totală medie a lăstarilor și greutatea totală medie în stare proaspătă a lăstarilor la plantele de control trebuie să fie cel puțin duble în timpul fazei de expunere a testului. În plus, plantele de control nu trebuie să prezinte simptome evidente cu ochiul liber de cloroză și trebuie să fie vizibil necontaminate cu alte organisme, cum ar fi alge și/sau filme bacteriene pe plante, la suprafața sedimentului și în mediul de testare.
12. Coeficientul mediu de variație pentru randament bazat pe măsurători ale greutateii lăstarilor în stare proaspătă (și anume, de la începutul până la sfârșitul testului) în culturile de control nu trebuie să depășească 35 % între probele duplicate.

SUBSTANȚA CHIMICĂ DE REFERINȚĂ

13. O substanță chimică de referință, cum ar fi 3,5-diclorofenol folosit la testul circular (9), se va testa periodic pentru a verifica performanța procedurii de testare de-a lungul timpului. Testul circular indică faptul că media valorilor EC_{50} la 3,5-DCP pentru variabile de măsurare diferite s-a situat între 4,7 și 6,1 mg/l (a se vedea raportul testului circular pentru detalii privind intervalul de încredere anticipat în jurul acestor valori). Este recomandabil să se testeze o substanță chimică cel puțin de două ori pe an sau, dacă testarea se desfășoară rar, în paralel cu teste de toxicitate definitive. Un ghid pentru valorile preconizate ale EC_{50} la 3,5-dcp este oferit în Raportul statistic privind testul circular internațional (9).

DESCRIEREA METODEI

Aparatura de testare

14. Testul trebuie să fie efectuat în condiții de mediu controlate, și anume într-o încăpere sau o cameră de creștere sau un laborator, cu durata, lumina și temperatura controlabile (a se vedea secțiunea „Condiții de testare”, punctele 56-58). Culturile stoc se mențin separat de vasele de testare.
15. Studiul se efectuează folosind vase de testare din sticlă cum ar fi acvarii sau pahare de laborator; în general se folosesc pahare de sticlă cu o capacitate de 2 l (cu o înălțime de aproximativ 24 cm și cu un diametru de 11 cm). Cu toate acestea, și alte vase (mai mari) se pot dovedi adecvate cu condiția să existe o adâncime suficientă a apei pentru a permite creșterea nelimitată și pentru a menține plantele submersate pe toată durata testului.
16. Ghivece din sticlă sau plastic (cu un diametru de aproximativ 9 cm, o înălțime de 8 cm și un volum de 500 ml) pot fi folosite ca recipiente pentru înglobarea plantelor în sediment. Alternativ, pot fi folosite pahare din sticlă, care sunt preferate în unele cazuri (de exemplu, testarea chimicalelor hidrofobice sau a substanțelor cu un K_{ow} ridicat).
17. Alegerea dimensiunii ghiveciului/paharului trebuie avută în vedere împreună cu alegerea vaselor de testare și a conceptului de testare preferat (a se vedea mai jos). În cazul în care se folosește conceptul de testare A (un lăstar per ghiveci cu trei ghivece per vas), este posibil să fie necesare ghivece sau vase mai mici. În cazul utilizării conceptului de testare B (trei lăstari per ghiveci și un ghiveci per vas), ghiveciul precizat și dimensiunile vasului ar trebui să corespundă. În toate cazurile, adâncimea minimă a apei acoperitoare trebuie stabilită la 12 cm peste nivelul superior al sedimentului, iar raportul dintre suprafața/volumul sedimentului și suprafața/volumul de apă trebuie să fie înregistrat.

Organismul de testare

18. Abordările generale descrise în această metodă de testare pot fi utilizate pentru a testa o serie de specii de plante acvatice. Cu toate acestea, condițiile prezentate în această metodă de testare au fost modificate pentru testarea pe *Myriophyllum spicatum*, din specia penița apei. Această specie aparține familiei de dicotiledonate, *Haloragaceae*.
19. *Myriophyllum spicatum* (penița apei eurasiatică) este o specie rădăcinoasă submersă care tolerează un interval larg de condiții și se găsește atât în apele stătătoare, cât și cele curgătoare. *M. spicatum* este o plantă perenă care pe timpul iernii moare până la rădăcină. De obicei, florile înfloresc și împrăștie semințe nestingherit, deși propagarea vegetativă din mugurii auxiliari sau fragmente de tulpină care se detașează natural sau în urma unei perturbări constituie adesea metoda principală de colonizare.

Cultivarea organismului de testare

20. Plantele pot fi obținute din populații naturale sau prin intermediul furnizorilor de plante acvatice. În ambele cazuri, sursa plantelor trebuie să fie documentată, iar identitatea speciilor trebuie să fie verificată. Trebuie să se acorde o atenție deosebită pentru a se asigura că se obține specia corectă atunci când se colectează *Myriophyllum spicatum* de pe teren, în special în regiuni unde aceasta se poate hibridiza cu alte specii de *Myriophyllum*. În cazul în care există dubii, se recomandă utilizarea unor culturi verificate de laborator din surse cunoscute. Plantele care au fost expuse la orice fel de contaminanți chimici sau colectate din situri despre care s-a stabilit că sunt contaminate nu trebuie să fie utilizate în acest test.
21. În regiunile unde *M. spicatum* se găsește greu în timpul lunilor de iarnă, se poate dovedi necesară întreținerea pe termen lung a culturilor stoc în condiții de seră sau de laborator. Culturile stoc trebuie menținute în condiții similare cu condițiile de testare, deși iradiația și temperatura pot fi reduse în vederea scăderii frecvenței de menținere a culturii (de exemplu, atunci când nu se planifică teste pe *Myriophyllum* pentru o perioadă). Utilizarea unor acvarii și ghivece mai mari, folosite ulterior la teste, este recomandată pentru a oferi spațiu pentru proliferare. Compoziția sedimentului și a mediului apos trebuie să fie aceeași cu cea folosită pentru teste, deși pot fi adoptate metode alternative de fertilizare a sedimentului (de exemplu, utilizarea formulelor comerciale de fertilizator cu eliberare prelungită).

22. Plantele stoc trebuie să fie lipsite în mod clar de orice contaminare cu alte organisme, inclusiv melci, alge filamentoase, ciuperci și insecte, de exemplu ouă sau larve de molie *Paraponyx stratiotata* sau larve și adulți de curculionide *Eubrychius velutus*. Clătirea materialului vegetal cu apă proaspătă se poate dovedi necesară pentru a elimina orice contaminare vizibilă. De asemenea, trebuie depuse eforturi pentru a minimiza dezvoltarea algelor unicelulare și contaminarea cu bacterii, însă sterilitatea completă a materialului vegetal nu este necesară. Culturile stoc trebui să fie monitorizate și transplantate în funcție de necesități, astfel încât să se evite dezvoltarea algelor și contaminarea bacteriană. Aerarea culturilor stoc se poate dovedi benefică în cazul în care contaminarea cu alge sau bacterii devine problematică.
23. În toate cazurile, plantele sunt cultivate/aclimatizate în condiții similare, dar nu neapărat identice cu cele utilizate în cadrul testului pentru o perioadă adecvată (și anume > 2 săptămâni) înainte de utilizarea lor în cadrul unui test.
24. Culturile stoc cu inflorescență nu trebuie să fie folosite într-un test deoarece vitezele de creștere vegetativă în general scad în timpul înfloririi și ulterior.

Sediment

25. Următorul sediment preparat, care are la bază sedimentul artificial descris în capitolul C. 28 din prezenta anexă (8), este recomandat pentru utilizare în cadrul acestui test. Sedimentul este preparat conform descrierii din TM C.28, cu excepția adaosului de nutrienți conform descrierii de mai jos:
- a) 4-5 % turbă (greutate uscată, în conformitate cu $2 \pm 0,5$ % carbon organic), cât mai aproape posibil de un pH între 5,5 și 6; este important să se folosească turbă pulbere măcinată fin (preferabil cu o dimensiune a particulei < 1 mm) și uscată doar la aer.
 - b) 20 % (greutate uscată) caolin (de preferință, cu conținut de caolinit de peste 30 %);
 - c) 75-76 % (greutate uscată) nisip cuarțos (trebuie să predominie nisipul fin, cu peste 50 % particule între 50 și 200 μm).
 - d) Se adaugă un mediu nutritiv apos astfel încât lotul final de sediment să conțină 200 mg/kg sediment uscat de clorură de amoniu și fosfat de sodiu, iar conținutul de umiditate din amestecul final să fie situat într-un interval de 30-50 %.
 - e) Carbonatul de calciu cu o calitate pură din punct de vedere chimic (CaCO_3) se adaugă pentru a ajusta pH-ul amestecului final al sedimentului la $7,0 \pm 0,5$.
26. Sursa de turbă, argilă caolin și nisip trebuie să fie cunoscută și documentată. În cazul în care originea este necunoscută sau generează un anumit nivel de preocupare, componentele respective trebuie să fie verificate, pentru a dovedi absența contaminării chimice (de exemplu, metale grele, compuși organici clorurați, compuși organici fosforici).
27. Conținutul uscat al sedimentului trebuie să fie amestecat în mod omogen înainte de a amesteca complet soluția nutritivă apoasă în sediment. Sedimentul umed trebuie preparat cu cel puțin două zile înainte de utilizare pentru a permite înmuierea turbei și pentru a împiedica particulele de turbă hidrofobă să plutească la suprafață atunci când peste sediment se așază mediul; înainte de utilizare, sedimentul umed poate fi păstrat la întuneric.
28. Pentru test, sedimentul se transferă în containere de mărime corespunzătoare, cum ar fi ghivece cu un diametru care se încadrează în vasele de sticlă (suprafața sedimentului trebuie să acopere aproximativ 70 % sau mai mult din suprafața vasului). În cazul în care containerul are orificii în partea de jos, o bucată de hârtie de filtru în partea inferioară a rezervorului va contribui la păstrarea sedimentului în recipient. Ghivecele sunt umplute cu sediment, astfel încât suprafața sedimentului să fie egală, înainte de acoperirea cu un strat subțire (~ 2 până la 3 mm) de material inert, cum ar fi nisip, pietriș fin măcinat (sau coral zdrobit) pentru a fixa sedimentul.

Mediul de testare

29. Pentru cultura și testarea *Myriophyllum spicatum*, se recomandă folosirea unui mediu Smart și Barko (12). Pregătirea acestui mediu este descrisă în apendicele 1. pH-ul mediului (faza apoasă) la începutul testului trebuie să fie cuprins între 7,5 și 8,0 pentru o creștere optimă a plantelor.

Conceptul experimental

30. Testul trebuie să includă cel puțin șase vase de testare duplicat pentru proba de control nesupusă tratamentului și minim patru vase de testare duplicat pentru fiecare dintre cele cel puțin cinci niveluri de concentrație.
31. Dacă determinarea NOEC nu este necesară, conceptul de testare poate fi modificată în sensul creșterii numărului de concentrații și al reducerii numărului de probe duplicat per concentrație
32. Fiecare vas de testare reprezintă o probă duplicat conținând trei lăstari. Există două opțiuni pentru cultivarea a trei lăstari în fiecare vas de testare:
 - conceptul de testare A: un lăstar per ghiveci și trei ghivece per vas.
 - conceptul de testare B: trei lăstari per ghiveci și un ghiveci per vas.
 - Conceptele alternative de testare cu un lăstar per vas de testare sunt acceptabile cu condiția ca duplicarea să corespundă criteriilor de validitate cerute.
33. Vasele de testare individuale trebuie să fie repartizate aleatoriu în grupurile de tratament. Vasele de testare se poziționează aleatoriu în zona de testare pentru a minimiza influența diferențelor spațiale în intensitatea luminii sau în temperatură.

Concentrațiile substanței chimice de testare și grupurile de control

34. În mod obișnuit, concentrațiile trebuie să urmeze o serie geometrică; factorul de separare între concentrațiile de testare nu trebuie să depășească 3,2. Cunoașterea în prealabil a toxicității substanței chimice de testare printr-un test de stabilire a intervalului va contribui la selectarea concentrațiilor potrivite de testare.
35. Pentru determinarea unei ECx, concentrațiile de testare trebuie să încadreze valoarea ECx în scopul asigurării unui nivel de încredere adecvat. De exemplu, dacă se estimează EC₅₀, cea mai mare concentrație de testare trebuie să fie mai mare decât valoarea EC₅₀. Dacă valoarea EC₅₀ se află în afara intervalului concentrațiilor de testare, intervalele de încredere aferente vor fi mari și există riscul ca evaluarea corectă a adecvării statistice a modelului să nu fie posibilă. Utilizarea mai multor concentrații de testare va îmbunătăți intervalul de încredere în jurul valorii rezultate a ECx.
36. Dacă se urmărește estimarea LOEC/NOEC (punct final opțional), concentrația cea mai scăzută de testare trebuie să fie suficient de scăzută încât creșterea să nu fie semnificativ mai mică decât cea a plantelor de control. În plus, concentrația cea mai mare de testare trebuie să fie suficient de mare încât creșterea să fie semnificativ mai mică decât cea a probei de control. Utilizarea mai multor probe duplicat va consolida puterea statistică a conceptului concentrației fără efect/ANOVA.

Test la valori-limită

37. În cazul în care un test de stabilire a intervalului arată că substanța chimică de testare nu are efecte adverse în concentrații de până la 100 mg/l sau până la limita sa de solubilitate în mediul de testare sau, în cazul unei formule până la limita de dispersabilitate, se poate efectua un test la valori-limită pentru a facilita compararea răspunsurilor unui grup de control și ale unui grup supus tratamentului – 100 mg/l sau o concentrație egală cu limita solubilității sau 1000 mg/kg sediment uscat. Un astfel de test trebuie să respecte principiile generale ale unui test standard doză-răspuns, cu excepția faptului că se recomandă creșterea numărului minim de probe duplicat la șase vase de testare per control și concentrație. Creșterea la grupul de control și la cel supus tratamentului poate fi analizată folosind un test statistic pentru compararea mediilor, de exemplu un test-t Student.

Soluții de testare

38. Soluțiile de testare se prepară de regulă prin diluarea unei soluții stoc, prin dizolvarea substanței chimice de testare sau prin dispersarea substanței chimice de testare în mediul Smart și Barko, folosind apă demineralizată (și anume, distilată sau deionizată) (a se vedea apendicele 1).

39. Concentrația cea mai mare de testare nu trebuie să depășească în mod normal solubilitatea în apă a substanței chimice de testare sau, în cazul formulelor, dispersabilitatea în condițiile de testare.
40. Pentru substanțele chimice de testare cu solubilitate scăzută în apă, poate fi necesară prepararea unei soluții stoc concentrate sau dispersia substanței chimice folosind un solvent organic sau un agent de dispersie, pentru a facilita adăugarea de cantități exacte de substanță de testare în mediul de testare și pentru a favoriza dispersia și dizolvarea acestora. Trebuie depuse toate eforturile pentru a evita utilizarea acestui tip de solvenți sau agenți de dispersie. Nu se vor folosi solvenți sau agenți de dispersie suplimentari în urma cărora să rezulte fitotoxicitate. De exemplu, solvenții obișnuiți, care nu provoacă fitotoxicitate la concentrații de până la 100 µl/l, includ acetona și dimetilformamida. Dacă se folosește un solvent sau un agent de dispersie, concentrația sa finală se raportează și se menține la valoarea minimă (≤ 100 µl/l). În aceste circumstanțe, toate probele de tratament și de control (cu solvent) trebuie să conțină aceeași concentrație de solvent sau agent de dispersie. Probele de control duplicate netratate care nu conțin un solvent sau un agent de dispersie sunt incluse, de asemenea, în conceptul de testare. Orientări suplimentare privind folosirea agenților de dispersie sunt prevăzute într-un document de orientare al OCDE (11).

PROCEDURA DE TESTARE

41. Procedura de testare variază în funcție de modul de utilizare a substanței chimice de testare (și anume, prin faza apoasă sau faza de sediment). Comportamentul preconizat al substanței chimice de testare într-un sistem apă-sediment trebuie luat în considerare pentru a explica alegerea regimului de expunere utilizat în test (și anume, static sau reînnoire statică, apă îmbogățită – sediment îmbogățit). Testele cu sediment îmbogățit pot fi preferate în unele cazuri pentru substanțele chimice prevăzute să se distribuie în mod semnificativ în sediment.

Faza de stabilire

42. Vârfurile lăstarilor sănătoși, și anume fără lăstari laterali, sunt tăiate din plantele de cultură lăsând o lungime a lăstarilor de 6 cm (± 1 cm). Pentru conceptul de testare A (un lăstar per ghiveci și trei ghivece per vas), se plantează vârfuri de lăstar în fiecare ghiveci. Pentru conceptul de testare B (trei lăstari per ghiveci și un ghiveci per vas), se plantează patru-cinci vârfuri de lăstar în fiecare ghiveci care conține sediment.
43. În ambele cazuri, ghivecele în plus trebuie cultivate pentru a permite selectarea unor plante uniforme la inițierea testului, dar și pentru a oferi plante de rezervă care vor fi utilizate pentru a analiza creșterea rădăcinii imediat înainte de începerea tratamentului, precum și plante de rezervă care sunt destinate recoltării pentru măsurarea biomasei și a lungimii lăstarilor în ziua 0.
44. Lăstarii se introduc astfel încât aproximativ trei centimetri, care acoperă cel puțin două noduri, să se afle sub suprafața sedimentului.
45. Ghivecele sunt transferate apoi în vasele de testare în aceleași condiții de mediu ca pentru faza de expunere și sunt menținute timp de șapte zile în mediu Smart și Barko pentru a stimula dezvoltarea rădăcinii.
46. După această perioadă, mai multe plante în ghivecele de rezervă trebuie scoase pentru a observa creșterea rădăcinii. În cazul în care creșterea rădăcinii nu este vizibilă (și anume, vârfurile rădăcinii nu sunt vizibile), atunci faza de stabilire trebuie prelungită până ce creșterea rădăcinii devine vizibilă. Această etapă este recomandată pentru a se asigura că plantele sunt în fază de creștere activă în momentul începerii testului.

Selectarea materialului vegetal uniform

47. Pentru conceptul de testare A (un lăstar per ghiveci și trei ghivece per vas), se aleg ghivece pentru uniformitate înainte de începerea testului. Pentru conceptul de testare B (trei lăstari per ghiveci și un ghiveci per vas), plantele excedente sunt îndepărtate astfel încât să rămână trei plante care sunt uniforme ca dimensiune și aspect.

Expunerea prin faza apoasă

48. Ghivecele, selectate astfel încât să fie uniforme, sunt introduse în vasele de testare conform conceptului experimental. Mediul Smart și Barko se adaugă apoi în vasele de testare. Trebuie acordată atenție pentru a evita deranjarea sedimentului. În acest scop, mediile se pot adăuga acoperind sedimentul cu o pâlnie sau un disc din plastic în timp ce se toarnă mediul în vasele de testare, cu condiția ca discul să fie înlăturat imediat. În mod alternativ, ghivecele pot fi puse în vasele de testare după adăugarea mediilor. În ambele cazuri, medii proaspete pot fi utilizate la începutul fazei de expunere, în cazul în care este necesar să se acționeze pentru a minimiza potențialul de acumulare de bacterii și alge sau pentru a permite pregătirea unei singure serii de soluție de testare pentru toate probele duplicate.
49. Lungimea lăstarilor deasupra sedimentului se măsoară, fie înainte sau după adăugarea mediului.
50. Cantități corespunzătoare din substanța chimică de testare pot fi adăugate la mediul de testare înainte de adăugarea acestuia în vasele de testare. Alternativ, substanța chimică de testare se poate introduce în mediu după ce acesta a fost adăugat în vasele de testare. În acest caz, trebuie acordată atenție pentru a se asigura că substanța chimică de testare este distribuită în mod omogen în întreg sistemul de testare fără a tulbura sedimentul.
51. În toate cazurile, aspectul (de exemplu, limpede, turbure etc.) mediului de testare se înregistrează la începerea testului.

Expunerea prin sediment

52. Sedimentele îmbogățite pentru concentrația aleasă sunt preparate prin adăugarea unei soluții a substanței chimice de testare direct în sedimentul proaspăt. O soluție stoc de substanță chimică de testare dizolvată în apă deionizată este amestecată cu sedimentul formulat cu ajutorul unui tambur, al unui malaxor sau prin amestecare manuală. În cazul în care este puțin solubilă în apă, substanța chimică de testare se poate dizolva într-un volum cât se poate de mic de solvent organic adecvat (de exemplu, hexan, acetonă sau clorofom). Această soluție este amestecată apoi cu 10 g de nisip de cuarț fin pentru un vas de testare. Se așteaptă evaporarea solventului, iar apoi nisipul este amestecat cu o cantitate adecvată de sediment în fiecare pahar de laborator. Pentru solubilizarea, dispersia sau emulsionarea substanței chimice de testare se pot folosi numai agenți cu volatilizare rapidă. Este necesar să se țină cont de faptul că volumul/greutatea nisipului îmbogățit cu substanța chimică de testare trebuie luat(ă) în considerare pentru prepararea finală a sedimentului (și anume, sedimentul trebuie să fie astfel preparat cu mai puțin nisip). Trebuie avut grijă ca substanța chimică de testare adăugată la sediment să fie distribuită complet și uniform în sediment.
53. Ghivecele se umplu cu sediment îmbogățit (conform descrierii de mai sus). Plantele, selectate astfel încât să fie uniforme și să aibă sistemul radicular adecvat, sunt scoase din ghivecele utilizate în timpul fazei de stabilire și sunt mutate în sedimentul îmbogățit, conform descrierii de mai sus.
54. Ghivecele sunt introduse în vasele de testare conform conceptului experimental. Mediul Smart și Barko se adaugă apoi cu grijă (și anume, utilizând o pâlnie) pentru a se evita perturbarea sedimentului. Se măsoară lungimea lăstarilor deasupra sedimentului, fie înainte sau după adăugarea mediului.

Menținerea nivelurilor apei pe durata testului

55. Volumul final de apă trebuie să fie înregistrat, iar nivelul apei este marcat pe fiecare vas de testare. În cazul în care apa se evaporă în timpul testului mai mult de 10 %, nivelul apei trebuie ajustat cu apă distilată. În cazul în care este necesar, paharele de laborator pot fi acoperite ușor cu un capac transparent, cum ar fi capace din plastic transparent pentru a se reduce la minim evaporarea și contaminarea cu spori de alge.

Condiții de testare

56. Se utilizează o lumină fluorescentă albă caldă și/sau rece pentru a oferi o iradianță luminoasă situată în intervalul de aproximativ $140 (\pm 20) \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ când se măsoară ca o radiație activă din punct de vedere fotosintetic (400-700 nm) la suprafața apei și folosind un raport lumină:întuneric de 16:8 ore. Orice diferență față de iradianță aleasă în zona de testare nu trebuie să depășească intervalul de $\pm 15 \%$.

57. Temperatura din vasele de testare este de 20 ± 2 °C.
58. Valoarea pH-ului mediului de control nu trebuie să crească cu mai mult de 1,5 unități în timpul testului. Cu toate acestea, o abatere de peste 1,5 unități nu va invalida testul dacă se poate demonstra că sunt îndeplinite criteriile de validitate specificate anterior.

Durata testului

59. Perioada de expunere este de 14 zile.

Măsurători și determinări analitice

60. După faza de stabilire și imediat înainte de tratament (și anume, în ziua 0), plantele de rezervă din cinci ghivece selectate aleatoriu pentru conceptul de testare care prevede trei plante per ghiveci sau din 15 ghivece pentru conceptul de testare care prevede o plantă per ghiveci, sunt recoltate pentru a evalua lungimea lăstarilor, greutatea în stare proaspătă și greutatea uscată, conform descrierii de mai jos.
61. Pentru plantele transferate în faza de expunere, următoarele evaluări se efectuează conform descrierii din tabelul 1:
- Evaluările lungimii lăstarului principal, ale numărului lăstarilor laterali și ale lungimii lăstarilor laterali se înregistrează cel puțin la sfârșitul perioadei de expunere (de exemplu, în ziua 14).
 - Evaluarea vizuală a sănătății plantelor se înregistrează cel puțin de trei ori în timpul perioadei de expunere (de exemplu, în zilele 0, 7 și 14).
 - Evaluările greutății lăstarilor în stare proaspătă și ale greutății uscate sunt efectuate la sfârșitul testului (și anume, 14).
62. Lungimea lăstarilor se determină utilizând o riglă. În cazul în care sunt prezenți lăstari laterali, numărul și lungimea acestora trebuie, de asemenea, să fie măsurate.
63. Evaluările vizuale ale sănătății plantelor sunt efectuate prin înregistrarea aspectului plantelor și a stării generale a mediului de testare. Observațiile care trebuie notate includ:
- Necroză, cloroză sau alt tip de decolorare cum ar fi înroșirea excesivă în raport cu plantele de control.
 - Dezvoltarea contaminării cu bacterii sau alge;
 - Anomalii de creștere precum întârzieri în dezvoltare, lungime internodală alterată, lăstari deformați/frunze deformate, proliferarea lăstarilor laterali, pierderea de frunze, pierderea turgorii și fragmentarea tulpinei.
 - Evaluările vizuale ale sănătății rădăcinii se efectuează la sfârșitul testului, prin spălarea cu grijă a sedimentului de pe rădăcini pentru a face posibilă observarea sistemului radicular. O scară propusă de evaluare în comparație cu plantele de control este prevăzută mai jos:
- 1) rădăcini absente
 - 2) rădăcini puține
 - 3) dezvoltare moderată a rădăcinii
 - 4) dezvoltare foarte bună a rădăcinii, similară plantelor de control
64. Evaluările greutății în stare proaspătă se realizează la începutul și la sfârșitul testării prin tăierea lăstarilor la nivelul sedimentului, urmată de o zvântare înainte de cântărire. Trebuie acordată atenție pentru a îndepărta particulele de sediment care pot adera la baza lăstarului. Materialul lăstarului este plasat ulterior într-un cuptor de uscare la aproximativ 60 °C și este uscat până la o greutate constantă, înainte de a de a-l cântări din nou și de a-i înregistra greutatea uscată.
65. Un rezumat al evaluărilor biologice minime necesare pe durata perioadei de testare este prevăzut în tabelul 1.

Tabelul 1

Programul de evaluare

Ziua ulterioară tratamentului (DAT)	<i>Myriophyllum spicatum</i>			
	Lungimea lăstarilor, lungimea și numărul lăsta- rilor laterali	Evaluarea vizuală a lăsta- rilor	Greutatea lăstarilor în stare proaspătă și greutatea us- cată, Evaluarea vizuală a rădăcini- lor	pH O ₂
0	A	A	A	A
4	—	—	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: indică faptul că sunt necesare evaluări cu aceste ocazii

—: indică faptul că măsurătorile nu sunt necesare

Frecvența măsurătorilor și determinărilor analitice

66. Temperatura mediului într-un vas suplimentar menținut în condiții similare în încăperea, incubatorul sau camera de creștere se înregistrează cel puțin o dată pe zi (sau în mod continuu, cu un înregistrator de date).
67. Valoarea pH-ului și concentrația oxigenului dizolvat din mediul de testare trebuie să fie verificate la începutul testului, cel puțin o dată în timpul testului și la sfârșitul studiului, în toate vasele duplicat. Cu fiecare ocazie, măsurătorile trebuie efectuate în același moment al zilei. În cazul în care sunt folosite soluții în vrac la prepararea tuturor vaselor duplicat la fiecare concentrație de testare, o singură măsurătoare pentru fiecare soluție este acceptabilă pentru fiecare soluție vrac în ziua 0.
68. Iradianța se măsoară în încăperea, incubatorul sau camera de creștere în puncte echivalente cu nivelul suprafeței apei. Măsurătorile se efectuează cel puțin o dată la începutul testului sau în timpul testului. Metoda de detectare și măsurare a luminii, în special tipul de senzor, va influența valoarea măsurată. Senzorii sferici (care răspund la lumină din toate unghiurile de deasupra și dedesubtul planului de măsurare) și senzorii „cosinus” (care răspund la lumină din toate unghiurile de deasupra planului de măsurare) sunt preferabili senzorilor unidirecționali și vor da valori mai mari pentru o sursă de lumină multipunct de tipul celei descrise aici.

Măsurători analitice ale substanței chimice de testare

69. Aplicarea corectă a substanței chimice de testare trebuie să fie susținută de măsurători analitice ale concentrațiilor acesteia.
70. Eșantioanele de apă trebuie să fie colectate pentru analiza substanței chimice testate la scurt timp după începerea testului (și anume, în ziua aplicării pentru substanțe chimice de testare stabile sau la o oră după aplicare pentru substanțe chimice care nu sunt stabile) și la încheierea testului pentru toate concentrațiile testate.
71. Concentrațiile în sediment și în apa interstițială din sediment trebuie stabilite la începutul și la sfârșitul testului, cel puțin pentru concentrația cea mai mare de testare, cu excepția cazului în care substanțele chimice de testare sunt cunoscute a fi stabile în apă (> 80 % din valoarea nominală). Măsurătorile în sediment și în apa interstițială se pot dovedi inutile în cazul în care partiționarea substanței chimice de testare între apă și sediment a fost clar determinată în cadrul unui studiu apă/sediment, în condiții comparabile (de exemplu, raportul sediment-apă, modul de aplicare, tipul de sediment).

72. Eșantionarea sedimentului la începutul testului ar putea să perturbe sistemul de testare. Prin urmare, este posibil să fie necesare vase de testare suplimentare tratate pentru a facilita determinările analitice la începutul și la sfârșitul testului. În mod similar, atunci când evaluările intermediare sunt considerate necesare, și anume în ziua a 7-a, iar analizele necesită un număr mare de eșantioane de sediment care nu pot fi îndepărtate cu ușurință din sistemul de testare, trebuie să se efectueze determinări analitice folosind vase de testare suplimentare, tratate în același mod precum cele utilizate pentru evaluările biologice.
73. Centrifugarea la, de exemplu, 10 000 g și 4 °C timp de 30 de minute, este recomandată pentru izolarea apei interstițiale. Cu toate acestea, în cazul în care se demonstrează că substanța chimică testată nu se absoarbe în filtre, filtrarea poate fi acceptabilă, de asemenea. În unele cazuri, nu se pot analiza concentrațiile în apa interstițială dacă dimensiunea eșantionului este prea mică.
74. Pentru testele în regim semistatic (și anume, expunerea prin intermediul fazei apoase), în cazul în care concentrația substanței (substanțelor) chimice de testare relevantă(e) nu este preconizată să rămână în intervalul de 20 % din concentrația nominală pe durata testului fără reînnoirea soluțiilor de testare, trebuie să se preleveze probe din soluții de testare folosite și proaspăt preparate pentru analiza concentrației substanței chimice testate la fiecare reînnoire.
75. În cazurile în care concentrația inițială măsurată a substanței testate nu se încadrează în 20 % din valoarea nominală, dar pot fi furnizate probe suficiente care să demonstreze că aceste concentrații inițiale sunt repetabile și stabile (și anume, în intervalul de 80-120 % din concentrația inițială), se pot efectua determinările chimice doar la concentrația cea mai mare de testare și la cea mai scăzută.
76. În toate cazurile, concentrațiile substanței chimice de testare se determină doar la un vas duplicat pentru fiecare concentrație de testare. În mod alternativ, soluțiile de testare ale tuturor probelor duplicat pentru fiecare concentrație pot fi cumulate pentru analiză.
77. Dacă există dovezi că s-a menținut concentrația substanței chimice de testare în intervalul de 20 % din concentrația nominală sau măsurată inițial, pe întreg parcursul perioadei de testare, atunci analiza rezultatelor și derivarea ulterioară a punctelor finale pot fi bazate pe valorile nominale sau măsurate inițial.
78. În astfel de cazuri, concentrațiile de efect trebuie să se bazeze pe concentrațiile nominale ale apei sau pe cele măsurate la începutul testului.
79. Cu toate acestea, în cazul în care există dovezi că o concentrație a scăzut (și anume, nu este menținută în limita a 20 % din concentrația nominală sau cea măsurată inițial în compartimentul tratat) pe toată durata testului, este necesar ca analiza rezultatelor să se exprime în funcție de media geometrică a concentrației în timpul expunerii sau în funcție de modelele care descriu declinul concentrației substanței chimice de testare în compartimentul tratat (11).

EVALUAREA DATELOR

80. În cazul în care utilizarea unui solvent/agent de dispersie este necesară, datele provenite din probele de control cu solvenți și cele fără solvenți pot fi cumulate în scopul analizelor statistice, cu condiția ca răspunsurile probelor de control cu solvenți și fără solvenți să nu fie diferite în mod semnificativ din punct de vedere statistic.

Variabile de răspuns

81. Scopul testului este de a determina efectele substanței de testare asupra creșterii vegetative a speciei testate, prin utilizarea a două variabile de răspuns, și anume viteza medie specifică de creștere și randamentul, după cum urmează:

Viteza medie specifică de creștere

82. Această variabilă de răspuns se bazează pe modificări logaritmice de lungime totală a lăstarilor, greutatea totală a lăstarilor în stare proaspătă și greutatea uscată totală a lăstarilor, de-a lungul timpului pentru probele de control și pentru fiecare grup supus tratamentului. Această variabilă se calculează pentru fiecare probă duplicat a fiecărei probe de control și pentru fiecare grup supus tratamentului. Lungimea medie și greutatea celor trei plante per vas de testare (duplicat) și, prin urmare, viteza de creștere pentru fiecare duplicat, trebuie calculate folosind următoarea formulă:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

unde:

μ_{i-j} : viteza medie specifică de creștere de la i la j

N_i : variabila de măsurare în vasul de testare sau de control la momentul i

N_j : variabila de măsurare în vasul de testare sau de control la momentul j

t: perioada de timp de la i la j

83. Din răspunsurile duplicat, o valoare medie a vitezei de creștere în paralel cu estimările varianței trebuie calculate pentru fiecare grup de tratament și control.
84. Viteza medie specifică de creștere se calculează pentru întreaga durată a testului (momentul „i” în formula de mai sus este începutul testului, iar momentul „j” este sfârșitul testului). Pentru fiecare concentrație de testare și fiecare probă de control, se calculează o valoare medie pentru viteza medie specifică de creștere în paralel cu estimarea varianței.
85. Inhibarea procentuală a vitezei de creștere (I_r) poate fi calculată pentru fiecare concentrație de testare (grup supus tratamentului) conform următoarelor formule:

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100$$

unde:

% I_r : inhibarea procentuală a vitezei medii specifice de creștere

μ_C : valoarea medie a μ în proba de control

μ_T : valoarea medie a μ în grupul supus tratamentului

Randamentul

86. Această variabilă de răspuns se bazează pe modificările în lungimea totală a lăstarilor, greutatea totală a lăstarilor în stare proaspătă și greutatea uscată totală a lăstarilor, de-a lungul timpului în probele de control și în fiecare grup supus tratamentului. Inhibarea procentuală medie a randamentului (% I_y) se poate calcula pentru fiecare grup supus tratamentului, după cum urmează:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

unde:

% I_y : reducerea procentuală a randamentului

b_c : biomasa finală minus biomasa inițială pentru grupul de control

b_T : biomasa finală minus biomasa inițială în grupul supus tratamentului

Reprezentare grafică a curbelor concentrație-răspuns

87. Se reprezintă grafic curbele concentrație-răspuns care fac legătura între media procentului de inhibare a variabilei de răspuns (I_p sau I_y), calculată conform descrierii de mai sus și logaritmul concentrației substanței chimice de testare.

Estimarea EC_x

88. Estimările EC_x (de exemplu, EC_{50}) trebuie să se bazeze atât pe viteza medie specifică de creștere (E_rC_x), cât și pe randament (E_yC_x), fiecare dintre acestea trebuind să se bazeze pe greutatea totală a lăstarilor în stare proaspătă, greutatea totală uscată a lăstarilor și lungimea totală a lăstarilor.
89. Trebuie remarcat că valorile EC_x calculate folosind cele două variabile de răspuns nu sunt comparabile, iar această diferență este recunoscută atunci când se folosesc rezultatele testului. Valorile EC_x bazate pe viteza medie specifică de creștere (E_rC_x) vor fi în cele mai multe cazuri mai mari decât rezultatele bazate pe randament (E_yC_x) – în cazul în care se aderă la condițiile de testare ale prezentei metode de testare – datorită bazei matematice a abordărilor respective. Această diferență nu se va interpreta ca o diferență de sensibilitate între cele două variabile de răspuns, valorile fiind diferite din punct de vedere matematic.

Proceduri statistice

90. Obiectivul este de a obține o relație cantitativă concentrație-răspuns prin analiza regresiei. Este posibilă folosirea unei regresii liniare ponderate după ce s-a efectuat o transformare de liniarizare a datelor de răspuns, de exemplu în funcția probit, logit sau unități Weibull (13), dar procedurile de regresie neliniară sunt tehnici preferate, care tratează mai bine inexactitățile inevitabile ale datelor și abaterile de la distribuțiile netede. Atunci când se apropie de zero sau în cazul unei inhibiții totale, aceste inexactități se pot amplifica prin transformare, interferând cu analiza (13). Trebuie remarcat că metodele standard de analiză folosind transformările probit, logit sau Weibull se utilizează în cazul datelor binare (de exemplu, date despre mortalitate sau supraviețuire) și trebuie să fie modificate pentru a putea fi aplicate la datele privind viteza de creștere și randamentul. Procedurile specifice pentru determinarea valorilor EC_x pe baza datelor continue pot fi consultate în referințele (14) (15) (16) (17).
91. Pentru fiecare variabilă de răspuns de analizat, se utilizează relația concentrație-răspuns pentru calcularea estimărilor punctuale ale valorilor EC_x . Limitele de încredere de 95 % pentru fiecare estimare sunt determinate, iar concordanța datelor de răspuns cu modelul de regresie se evaluează în mod grafic sau statistic. Analiza regresiei se efectuează folosind răspunsuri individuale ale probelor duplicate, nu medii ale grupului supus tratamentului.
92. Estimările și limitele de încredere ale EC_{50} pot fi obținute, de asemenea, folosind interpolarea liniară cu „bootstrap” (18), dacă modelele/metodele de regresie disponibile sunt inadecvate pentru date.
93. Pentru estimarea LOEC și, prin urmare, a NOEC, este necesară compararea mediilor probelor supuse tratamentului folosind tehnici de analiză a varianței (ANOVA). Media pentru fiecare concentrație se compară apoi cu media probei de control folosind o metodă de testare corespunzătoare (de exemplu, testele Williams sau Dunnett) (19) (20) (21) (22). Este necesar să se evalueze dacă se verifică ipoteza ANOVA de distribuție normală (ND) și de omogenitate a varianței (VH). Această evaluare trebuie realizată folosind testul Shapiro-Wilks (ND) sau testul Levene (VH). Neîndeplinirea ipotezei ND sau de omogenitate a varianțelor poate fi corectată uneori prin transformarea logaritmică a datelor. Dacă eterogenitatea varianței și/sau abaterea de la ND este extremă și nu poate fi corectată prin transformare, se va lua în considerare analiza prin metode precum testul-t Bonferroni-Welch, testul regresiv Jonkheere Terpstra și testul median Bonferroni. Orientări suplimentare privind determinarea NOEC sunt disponibile în referința (16).

RAPORTAREA

94. Raportul de testare include următoarele detalii:

Substanța chimică testată

Substanță mono-constituent:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

- identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

substanțe multi-constituent, UVCB și amestecuri:

- în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale constituenților.

Speciile folosite pentru testare:

- denumirea științifică și sursa.

Condițiile de testare

- durata și condițiile fazei de stabilire;
- procedura de testare folosită (statică, semistatică, cu impulsuri);
- data începerii testului și durata sa;
- mediul de testare, și anume sedimentul și mediul lichid nutritiv;
- descrierea conceptului experimental: încăperea/camera sau laboratorul de creștere, vasele de testare și capacele, volumele soluțiilor, lungimea și greutatea plantelor de testare per vas de testare la începutul testului, raportul dintre suprafața sedimentului și suprafața apei, raportul dintre volumul sedimentului și al apei;
- concentrațiile de testare (nominale și măsurate după caz) și numărul de probe duplicat per concentrație;
- metodele de preparare a soluțiilor stoc și a soluțiilor de testare, inclusiv folosirea oricărui solvent sau agent de dispersie;
- temperatura în timpul testului;
- sursa de lumină, iradianța ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)
- valorile pH-ului mediilor de testare și de control, precum și aspectul mediilor de testare la începutul și la sfârșitul testului;
- concentrațiile oxigenului;
- metoda de analiză cu date adecvate de evaluare a calității (studii de validare, abateri standard sau limite de încredere ale analizelor);
- metode pentru determinarea variabilelor de măsurare; de exemplu, lungime, greutate uscată, greutate în stare proaspătă;
- orice abatere de la această metodă de testare.

Rezultate

- date brute: lungimea lăstarilor și greutatea lăstarilor plantelor/ghiveci și alte variabile de măsurare în fiecare vas de testare și de control la fiecare observație și ocazie de analiză potrivit programului de evaluare prezentat în tabelul 1;
- mediile și abaterile standard pentru fiecare variabilă de măsurare;
- curbele de creștere pentru fiecare concentrație;
- timpul de duplicare/viteza de creștere în proba de control pe baza lungimii și greutatei lăstarilor în stare proaspătă, inclusiv coeficientul de variație pentru randamentul greutatei în stare proaspătă;
- variabilele de răspuns calculate pentru fiecare probă duplicat supusă tratamentului, cu valori medii și coeficient de variație pentru probele duplicat;
- reprezentarea grafică a relației concentrație-efect;
- estimările punctelor finale toxice pentru variabilele de răspuns, de exemplu EC_{50} , și intervalele de încredere asociate, dacă au fost calculate, LOEC și/sau NOEC și metodele statistice folosite pentru determinarea acestora;

- dacă s-a folosit analiza ANOVA, dimensiunea efectului care poate fi detectat (de exemplu, diferența minimă semnificativă);
- orice stimulare a creșterii constatată în cazul oricărui tratament;
- orice indicii vizuale de fitotoxicitate, precum și observațiile soluțiilor de testare;
- discutarea rezultatelor, inclusiv orice influență asupra rezultatului testului rezultată din abaterile de la această metodă de testare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) Capitolul C.26 din prezenta anexă: Test de inhibare a creșterii asupra *Lemna* sp.
- (2) Capitolul C.3 din prezenta anexă: Alge de apă dulce și cianobacterii, test de inhibare a creșterii.
- (3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.
- (4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, pp. 199-206.
- (5) ISO 16191:2013 Water quality – Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of *Myriophyllum aquaticum*.
- (6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, pp. 715-722.
- (7) Capitolul C.50 din prezenta anexă: Test de toxicitate fără sediment asupra *Myriophyllum spicatum*.
- (8) Capitolul C.28 din prezenta anexă: Test de toxicitate asupra chironomidelor într-un sistem apă-sediment încărcat.
- (9) Ratte, M., H. Ratte (2014), „Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris.
- (10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, pp. 231 – 237.
- (11) OECD (2000), „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.
- (12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, pp. 251-263.
- (13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, pp. 713-718.
- (14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, pp. 157-167.
- (15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/10, 1485-1494.
- (16) OECD (2006), „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.
- (17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, Vol. 29/2, pp/ 93-96.

-
- (18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
- (19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of the American Statistical Association, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.
- (20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, Vol. 20/3, pp. 482-491.
- (21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, Vol. 27/1, pp. 103-117.
- (22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, Vol. 28/2, pp. 519-531.
-

Apendicele 1

COMPOZIȚIA MEDIULUI SMART ȘI BARKO

Componentă	Cantitatea de reactiv adăugat în apă (*) (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	91,7
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	69,0
NaHCO_3	58,4
KHCO_3	15,4
pH (principiul echilibrului aerian)	7,9
(*) apă demineralizată (și anume, distilată sau deionizată)	

Apendicele 2

DEFINIȚII

Biomasă înseamnă greutatea uscată a materiei vii prezentă într-o populație. În acest test, biomasa este suma lăstarului principal, a ramurilor laterale și a tuturor rădăcinilor.

Substanță chimică înseamnă o substanță sau un amestec.

Cloroză înseamnă schimbarea de colorit de la verde la galben a organismului de testare, în special a vârtejurilor.

EC_x înseamnă concentrația substanței chimice de testare dizolvată în mediul de testare din care rezultă o reducere de x % (de exemplu, 50 %) a creșterii *Myriophyllum spicatum* într-o anumită perioadă de expunere (care se menționează explicit în cazul în care există abateri de la durată completă sau normală a testului). Pentru a reprezenta în mod clar o valoare EC derivată din viteza de creștere sau din randament, se folosesc simbolurile „E_tC” pentru viteza de creștere și, respectiv, „E_rC” pentru randament, urmate de variabila de măsurare folosită, de exemplu E_tC (lungimea lăstarului principal).

Creștere înseamnă o mărire a variabilei de măsurare, cum ar fi lungimea lăstarului principal, lungimea totală a ramurilor laterale, lungimea totală a lăstarilor, lungimea totală a rădăcinii, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată sau numărul vârtejurilor, de-a lungul perioadei de testare.

Viteză de creștere (viteza medie specifică de creștere) înseamnă creșterea logaritmică a variabilei de măsurare în timpul perioadei de expunere. *Notă:* Variabilele de răspuns legate de viteza de creștere sunt independente de durată testului atât timp cât tendința de creștere a organismelor de control neexpuse este exponențială.

Concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) înseamnă cea mai scăzută concentrație de testare la care se observă că substanța chimică are un efect de reducere semnificativ din punct de vedere statistic asupra creșterii (la $p < 0,05$) în comparație cu proba de control, într-un anumit timp de expunere. Cu toate acestea, toate concentrațiile de testare mai mari decât LOEC trebuie să aibă un efect nociv egal cu sau mai mare decât cele observate la LOEC. Atunci când cele două condiții menționate nu pot fi satisfăcute, trebuie furnizată o explicație completă a modului de alegere a LOEC (și, prin urmare, NOEC).

Variabile de măsurare înseamnă orice tip de variabile care sunt măsurate pentru a exprima punctul final de testare folosind una sau mai multe variabile de răspuns. În această metodă de testare, lungimea lăstarului principal, lungimea totală a ramurilor laterale, lungimea totală a lăstarilor, lungimea totală a rădăcinii, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată și numărul vârtejurilor reprezintă variabile de măsurare.

Monocultură înseamnă o cultură cu o singură specie de plante.

Necroză înseamnă un țesut mort (și anume, alb sau maro închis) al organismului de testare.

Concentrație la care nu se observă niciun efect (NOEC) înseamnă concentrația de testare situată imediat sub LOEC.

Variabilă de răspuns înseamnă orice variabilă pentru estimarea toxicității derivate din orice variabilă măsurată care descrie biomasa prin diferite metode de calcul. Pentru această metodă de testare, viteza de creștere și randamentul sunt variabile de răspuns derivate din variabile de măsurare precum lungimea lăstarului principal, lungimea totală a lăstarilor, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată sau numărul de vârtejuri.

Test (de reînnoire) semistatic înseamnă un test în care soluția de testare se înlocuiește periodic, la intervale specifice pe durată testului.

Test static înseamnă o metodă de testare care nu presupune reînnoirea soluției de testare pe durată testului.

Substanță chimică de testare înseamnă orice substanță sau amestec de substanțe testat(ă) utilizând această metodă de testare.

Punctul final de testare descrie factorul general care va fi modificat de substanța chimică de testare în comparație cu proba de control, acesta fiind obiectivul testului. În această metodă de testare, punctul final de testare este inhibarea creșterii, care poate fi exprimată prin diferite variabile de răspuns bazate pe una sau mai multe variabile de măsurare.

Mediu de testare înseamnă mediul de cultură sintetic complet în care cresc plantele testate atunci când sunt expuse la substanța chimică de testare. În mod normal, substanța chimică de testare va fi dizolvată în mediul de testare.

UVCB este o substanță cu compoziție necunoscută sau variabilă, produs de reacție complexă sau material biologic.

Randament reprezintă valoarea unei variabile de măsurare pentru exprimarea biomasei la sfârșitul perioadei de expunere minus variabila de măsurare la începutul perioadei de expunere. Notă: În cazul în care tendința de creștere a organismelor neexpuse este exponențială, variabilele de răspuns bazate de randament vor descrește odată cu durata testului.”
