

Bruxelles, 25 februarie 2019
(OR. en)

6800/19
ADD 2

COMPET 206
ENV 212
CHIMIE 36
MI 195
ENT 53
SAN 104
CONSOM 77
EMPL 121
SOC 153

NOTĂ DE ÎNȘOTIRE

Sursă:	Comisia Europeană
Data primirii:	22 februarie 2019
Destinatar:	Secretariatul General al Consiliului
Nr. doc. Csie:	Annex to D060575
Subiect:	Anexă la REGULAMENTUL (UE) .../... AL COMISIEI din XXX 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) 6800/19 COMPET 206 ENV 212 CHIMIE 36 MI 195 ENT 53 SAN 104 CONSOM 77 EMPL 121 SOC 153

În anexă, se pune la dispoziția delegațiilor documentul Annex to D060575.

Anexă: Annex to D060575

B.71 TESTELE *IN VITRO* PRIVIND SENSIBILIZAREA CUTANATĂ, CARE ABORDEAZĂ EVENIMENTUL IMPORTANT PRIVIND ACTIVAREA CELULELOR DENDRITICE ASUPRA PARCURSULUI RĂSPUNSURILOR ADVERSE (ADVERSE OUTCOME PATHWAY - AOP) PENTRU SENSIBILIZAREA CUTANATĂ

INTRODUCERE GENERALĂ

Metodă de testare bazată pe evenimentul important privind activarea celulelor dendritice

1. 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 al Parlamentului European și al Consiliului privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP)¹. 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 (AOP) în cadrul programului OCDE AOP (2), începând cu evenimentul declanșator molecular, prin evenimentele intermediare, până la efectele adverse, și anume dermatita alergică de contact. În acest caz, evenimentul declanșator molecular (mai exact, primul eveniment important) este reprezentat de legarea covalentă a substanțelor electrophile de centrele nucleofile din proteinele din piele. Al doilea eveniment important în acest AOP se desfășoară în cheratinocite și include răspunsuri inflamatorii, precum și modificări ale expresiei genice asociate 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 (CD), de regulă evaluate prin exprimarea markerilor celulari de suprafață specifici, chemochine și citocine. Al patrulea eveniment important este activarea și proliferarea celulară T, care este evaluată în mod indirect în testul local asupra ganglionilor limfatici murini (LLNA) (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 353/1, 31.12.2008

2. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE (TG) privind testarea nr. 442E (2017). Aceasta descrie teste *in vitro* care abordează mecanismele descrise în cadrul evenimentului important privind activarea celulelor dendritice ale AOP pentru sensibilizarea cutanată (2). MT cuprinde teste care urmează să fie utilizate pentru susținerea diferențierii între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante în conformitate cu GHS al ONU și Regulamentul CLP.

Testele descrise în prezenta MT sunt:

- Testul de activare a liniilor celulare umane (h-CLAT)
 - Testul U937 de activare a liniilor celulare (U-SENS TM)
 - Testul Interleuk-8 Reporter Gene Assay (testul IL-8 Luc)
3. Testele incluse în această metodă de testare și în Orientarea TG corespunzătoare a OCDE pot fi diferite în ceea ce privește procedura utilizată pentru a genera datele și valorile măsurate, dar pot fi utilizate în mod nediscriminatoriu pentru a aborda cerințele țărilor pentru rezultatele testelor privind evenimentul cheie cu privire la activarea celulelor dendritice ale AOP pentru sensibilizarea cutanată, beneficiind în același timp de acceptarea reciprocă a datelor a OCDE.

Context și principii ale testelor incluse în metoda de testare bazată pe evenimentul important

4. Evaluarea sensibilizării cutanate a implicat, de regulă, utilizarea de animale de laborator. Metodele clasice care utilizează cobai, testul de maximizare pe cobai (GPMT) al lui Magnusson și Kligman și testul Buehler (MT B.6) (4) evaluează atât fazele de inducție, cât și cele de reacție de hipersensibilitate a sensibilizării cutanate. Testele pe murini, LLNA (MT B.42) (3) și cele două variante ale sale care nu sunt radioactive, LLNA: DA (MT B.50) (5) și LLNA: BrdU-ELISA (MT B.51) (6), toate evaluează exclusiv răspunsul de inducție și, de asemenea, au fost acceptate, întrucât acestea oferă un avantaj față de testele pe cobai din punctul de vedere al bunăstării animalelor, alături de o măsurare obiectivă a fazei de inducție a sensibilizării cutanate.
5. Au fost adoptate metode de testare *in chemico* și *in vitro* recente, care sunt bazate pe mecanică și care abordează primul eveniment important [(MT B.59; Testul reactivității directe a peptidelor (7)] și al doilea eveniment important [(MT B.60; metoda de testare ARE-Nrf2 ale luciferazei (8)] al sensibilizării cutanate AOP, pentru a contribui la evaluarea potențialului de pericol de sensibilizare cutanată pe care îl prezintă substanțele chimice.
6. Încercările descrise în prezenta metodă de testare măsoară fie modificarea în exprimarea markerului (markerilor) celular(i) de suprafață asociat (asociați) procesului de activare a

monocitelor și a CD în urma expunerii la substanțe sensibilizante (de exemplu: CD54, CD86), fie modificările în exprimarea IL-8, o citocină asociată cu activarea CD. Au fost raportate substanțe sensibilizante pentru piele pentru a induce exprimarea markerilor cu membrană celulară, precum CD40, CD54, CD80, CD83 și CD86, în plus față de inducerea citocinelor proinflamatorii, precum IL-1 β și TNF- α , precum și a mai multor chemochine, inclusiv IL-8 (CXCL8) și CCL3 (9) (10) (11) (12), asociate cu activarea CD (2).

7. Însă, întrucât activarea CD reprezintă doar un singur eveniment important al AOP privind sensibilizarea cutanată (2) (13), este posibil ca informațiile obținute în urma testelor care măsoară doar markerii activării CD să nu fie suficiente pentru a concluziona cu privire la prezența sau absența potențialului de sensibilizare cutanată al substanțelor chimice. Prin urmare, datele obținute în urma testelor descrise în cadrul acestei metode de testare sunt propuse pentru susținerea diferențierii dintre substanțele sensibilizante pentru piele (mai exact, categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și substanțele nesensibilizante atunci când sunt utilizate în cadrul strategiilor integrate pentru testare și evaluare (IATA), împreună cu alte informații suplimentare relevante, de exemplu, cele rezultate din teste *in vitro* care abordează alte evenimente importante ale AOP privind sensibilizarea cutanată, precum și metode care nu implică testarea, inclusiv extrapolări ale datelor referitoare la substanțe chimice analoge (13). Exemple de utilizare de date generate în urma acestor teste în cadrul abordărilor definite, mai exact, al abordărilor standardizate atât în legătură cu setul de surse informaționale utilizate, cât și în cadrul procedurii aplicate datelor pentru obținerea de previziuni, au fost publicate (13) și pot fi folosite ca elemente utile în cadrul IATA.
8. Testele descrise în prezenta metodă de testare nu pot fi folosite pe cont propriu, nici pentru a subclasifica substanțele sensibilizante pentru piele în subcategoriile 1A și 1B, astfel cum sunt definite în GHS al ONU/Regulamentul CLP, pentru autoritățile care pun în aplicare aceste două subcategorii opționale, și nici pentru a prevedea potența pentru deciziile în materie de evaluare a siguranței. Cu toate acestea, în funcție de cadrul de reglementare, rezultatele pozitive obținute cu aceste metode pot fi utilizate în mod independent pentru a clasifica o substanță chimică în categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP.
9. Termenul „substanță chimică de testat” este utilizat în această metodă de testare pentru a se referi la ceea ce este supus testării¹ și nu are legătură cu aplicabilitatea testelor la testarea

¹ În iunie 2013, reuniunea comună a OCDE a convenit că, acolo unde este posibil, ar trebui aplicată o utilizare mai consecventă a termenului „substanță chimică de testat” care descrie ceea ce este testat în orientările OCDE noi și actualizate privind testele.

substanțelor monocomponente și a substanțelor și/sau amestecurilor multicomponente. În prezent sunt disponibile informații limitate privind aplicabilitatea testelor la substanțe/amestecuri multicomponente (14) (15). Cu toate acestea, testele sunt aplicabile din punct de vedere tehnic pentru testarea substanțelor și amestecurilor multicomponente. 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 respectiv¹. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului. În plus, atunci când se testează substanțe sau amestecuri multicomponente, se ia în considerare posibila interferență a componentelor citotoxice cu răspunsurile observate.

¹ Această teză a fost propusă și convenită în cadrul reuniunii WNT din aprilie 2014

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) Organizația Națiunilor Unite ONU (2015). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS). A șasea ediție revizuită. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Publicație disponibilă la adresa: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.
- (2) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Publicație disponibilă la adresa: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=E NV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=E NV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
- (3) Capitolul B.42 din prezenta anexă: Studiu pe ganglionul limfatic local. Capitolul B.6 din prezenta anexă: Sensibilizare cutanată.
- (4) Capitolul B.50 din prezenta anexă: Sensibilizare cutanată: Studiu pe ganglionul limfatic local: DA.
- (5) Capitolul B.51 din prezenta anexă: Sensibilizare cutanată: Studiu pe ganglionul limfatic local: BrdU-ELISA.
- (6) Capitolul B.59 din prezenta anexă: Sensibilizarea cutanată in chemico: Testul reactivității directe a peptidelor (Direct Peptide Reactivity Assay – DPRA).
- (7) Capitolul B.60 din prezenta anexă: Sensibilizarea cutanată *in vitro*: Metoda de testare a ERA-Nrf2 ale luciferazei.
- (8) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-96.
- (9) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL și Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841-7.
- (10) Aiba S, Terunuma A, Manome H și Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031-8.
- (11) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y și Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of

dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390-8.

- (12) OCDE (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, anexe 1 și 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: <https://community.oecd.org/community/iatass>.
- (13) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (14) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

Apendicele 1

SENSIBILIZAREA CUTANATĂ *IN VITRO*: TESTUL DE ACTIVARE A LINIILOR CELULARE UMANE (H-CLAT)

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

1. Testul h-CLAT cuantifică modificările produse la nivelul exprimării markerilor celulari de suprafață asociați cu procesul de activare a monocitelor și celulelor dendritice (CD) (și anume, CD86 și CD54), la nivelul liniei celulare monocitice umane THP-1 afectate de leucemie în urma expunerii la substanțe sensibilizante (1)(2). Nivelurile de exprimare măsurate ale markerilor celulari de suprafață CD86 și CD54 sunt apoi utilizate pentru susținerea diferențierii între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante.
2. Testul h-CLAT a fost evaluat într-un laborator de referință al Uniunii Europene pentru metode alternative la testarea pe animale (EURL ECVAM) - un studiu de validare coordonat și o evaluare inter pares independentă ulterioară desfășurată de către Comitetul științific consultativ al EURL ECVAM (ESAC). Având în vedere toate dovezile disponibile și contribuțiile autorităților de reglementare și ale părților interesate, testul h-CLAT a fost recomandat de EURL ECVAM (3) pentru a fi utilizat în cadrul unei IATA în vederea sprijinirii diferențierii între substanțele sensibilizante și cele nesensibilizante în scopul clasificării și etichetării pericolelor. Exemple privind utilizarea datelor h-CLAT în combinație cu alte informații sunt prezentate în referințele bibliografice (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).
3. Testul h-CLAT s-a dovedit a fi transferabil către laboratoare cu experiență în tehnici de cultură celulară și analiza citometriei de flux. Nivelul de reproductibilitate în estimări, care poate fi preconizat în urma testării, este de ordinul a 80 % în cadrul aceluiași laborator și între laboratoare (3) (12). Rezultatele generate și incluse în studiul de validare (13), precum și în alte studii publicate (14), indică, în general, faptul că, în comparație cu rezultatele LLNA, precizia de deosebire a substanțelor sensibilizante pentru piele (și anume, categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) de cele nesensibilizante este de 85 % (N = 142) cu o sensibilitate de 93 % (94/101) și o specificitate de 66 % (27/41) (pe baza unei analize repetate efectuate de EURL ECVAM (12), având în vedere toate datele existente și neluând în calcul rezultatele negative pentru substanțele chimice cu o valoare a Log Kow mai mare de 3,5, astfel cum este descris la alineatul (4). Există o probabilitate mai mare ca estimările negative false realizate prin testul h-CLAT să vizeze substanțe chimice care prezintă un nivel scăzut până la moderat de potență de sensibilizare cutanată (și anume, subcategoria 1B din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și nu substanțe chimice care prezintă un nivel ridicat de potență de sensibilizare cutanată (și anume, subcategoria

1A din GHS al ONU/Regulamentul CLP) (4) (13) (15). Coroborate, aceste informații indică utilitatea metodei h-CLAT în ceea ce privește contribuția la identificarea pericolelor de sensibilizare cutanată. Cu toate acestea, valorile de precizie furnizate în prezentul document pentru testul h-CLAT ca test independent sunt doar orientative, întrucât testul ar trebui luat în considerare în combinație cu alte surse de informații în contextul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la alineatele (7) și (8) din Introducerea generală. În plus, la evaluarea metodelor care nu se bazează pe animale pentru sensibilizarea cutanată, ar trebui reținut faptul că este posibil ca testul LLNA și alte teste pe animale să nu reflecte pe deplin situația oamenilor.

4. Pe baza datelor disponibile, metoda h-CLAT s-a dovedit a fi aplicabilă substanțelor chimice de testat care acoperă o varietate de grupe organice funcționale, mecanisme de reacție, potență de sensibilizare cutanată (astfel cum a fost stabilit în cadrul studiilor *in vivo*), precum și proprietăți fizico-chimice (3) (14) (15). Metoda h-CLAT se aplică substanțelor chimice de testat solubile sau care formează dispersii stabile (și anume, un coloid sau o suspensie în care substanța chimică de testat nu se sedimentează sau se separă de solvent/vehicul în diferite faze) într-un solvent/vehicul adecvat [a se vedea alineatul (14)]. Substanțele chimice de testat cu un Log Kow mai mare de 3,5 tind să producă rezultate negative false (14). Prin urmare, nu ar trebui să fie luate în considerare rezultatele negative obținute în cazul substanțelor chimice de testat având o valoare Log Kow mai mare de 3,5. Cu toate acestea, rezultatele pozitive obținute în cazul substanțelor chimice de testat având o valoare Log Kow mai mare de 3,5 ar putea fi totuși utilizate pentru a sprijini identificarea substanței chimice de testat ca substanță sensibilizantă pentru piele. În plus, din cauza capacității metabolice limitate a liniei celulare utilizate (16), cât și din cauza condițiilor experimentale, prohaptenele (și anume, substanțele care necesită activare enzimatică, de exemplu prin intermediul enzimelor P 450) și prehaptenele (și anume, substanțe activate prin autooxidare), în special cele cu o rată de oxidare lentă, pot furniza, de asemenea, rezultate negative la testul h-CLAT (15). Substanțele chimice de testat fluorescente pot fi analizate prin testul h-CLAT (17); cu toate acestea, substanțele chimice de testat fluorescente puternice care emit la aceeași lungime de undă ca și izotiocianatul de fluoresceină (FITC) sau iodura de propidiu (PI) vor interfera cu detecția prin citometria de flux și, astfel, nu pot fi evaluate în mod corect folosind anticorpi conjugați cu FITC sau PI. Într-un astfel de caz, se pot folosi alți anticorpi marcați cu fluorocrom sau alți markeri de citotoxicitate, cu condiția să se poată demonstra că acestea oferă rezultate similare celor generate de anticorpii marcați cu FITC [a se vedea alineatul (24)] sau PI [a se vedea alineatul (18)], de exemplu prin testarea substanțelor de verificare din appendicele 1-2. Având în vedere cele de mai sus, rezultatele negative ar trebui interpretate în contextul limitărilor menționate și împreună cu alte surse de informații în cadrul IATA. În cazul în care există dovezi care demonstrează lipsa de

aplicabilitate a metodei h-CLAT la alte categorii specifice de substanțe chimice de testat, acestea nu ar trebui utilizate pentru respectivele categorii specifice.

5. Conform descrierii de mai sus, metoda h-CLAT susține diferențierea între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante. Însă aceasta poate să contribuie, de asemenea, la evaluarea potenței de sensibilizare (4)(5)(9) atunci când este utilizată în abordări integrate precum IATA. Cu toate acestea, se impun studii suplimentare, de preferință pe baza datelor cu privire la oameni, pentru a determina în ce mod ar putea rezultatele h-CLAT să fundamenteze evaluarea potenței.
6. Definițiile sunt prevăzute în apendicele 1.1.

PRINCIPIUL TESTULUI

7. Metoda h-CLAT reprezintă un test *in vitro* care cuantifică modificările expresiei markerului celular de suprafață (și anume, CD86 și CD54) pe o linie celulară monocitică umană afectată de leucemie, celule THP-1, în urma expunerii timp de 24 de ore la substanța chimică de testat. Aceste molecule de suprafață constituie markeri tipici de activare THP-1 monocitică și pot imita activarea DC, care joacă un rol esențial în pregătirea de celule de tip T. Modificările expresiei markerului de suprafață se măsoară prin citometria de flux în urma colorării celulelor cu anticorpi marcați cu fluorocrom. De asemenea, măsurarea citotoxicității este efectuată în același timp cu scopul de a se evalua dacă se produce o reglare în sus a expresiei markerului de suprafață în cazul concentrațiilor subcitotoxice. Intensitatea relativă a fluorescenței markerilor de suprafață, în comparație cu martorul tratat cu solvent/vehicul, se calculează și se utilizează în modelul predictiv [a se vedea alineatul (26)], pentru a susține diferențierea între substanțe sensibilizante și nesensibilizante

DEMONSTRAREA PERFORMANȚEI

8. Înainte de a introduce testul descris în prezentul apendice la metoda de testare B.71 pentru utilizare de rutină, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice utilizând cele zece substanțe de verificare menționate în apendicele 1.2. În plus, utilizatorii testului ar trebui să întrețină o bază de date istorică incluzând date generate în urma verificărilor de reactivitate [a se vedea alineatul (11)] și a martorilor pozitivi și a celor tratați cu solvenți/vehicule [a se vedea alineatele (20)-(22)] și să utilizeze aceste date pentru a confirma faptul că reproductibilitatea testului în laboratorul lor este menținută în timp.

PROCEDURA

9. Acest test este bazat pe protocolul nr. 158 (18) h-CLAT DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM), 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 h-CLAT în laborator. Componentele și procedurile principale pentru metoda h-CLAT sunt descrise în continuare, în două etape: *testul de determinare a dozei și măsurarea expresiei CD86/CD54*.

Pregătirea celulelor

10. Linia celulară monocitică umană afectată de leucemie, și anume THP-1, ar trebui să fie utilizată pentru desfășurarea metodei h-CLAT. Se recomandă ca celulele (TIB-202™) să fie obținute de la o bancă de celule calificată, cum ar fi American Type Culture Collection.
11. Celulele THP-1 sunt cultivate la 37 °C în atmosferă de 5 % CO₂ și de umiditate, în mediu RPMI-1640 completat cu 10 % ser fetal bovin (FBS), 0,05 mM 2-mercaptoetanol, 100 de unități/ml de penicilină și 100 μg/ml de streptomycină. Poate fi evitată utilizarea penicilinei și a streptomicinei în mediul de cultură. Însă, într-un astfel de caz, utilizatorii ar trebui să verifice dacă absența antibioticelor din mediul de cultură nu are niciun impact asupra rezultatelor, de exemplu prin testarea substanțelor de verificare enumerate în apendicele 1.2. În orice caz, pentru a reduce la minimum riscul de contaminare, bunele practici de cultură celulară ar trebui să fie urmate independent de prezența sau absența antibioticelor în mediul de cultură celulară. Celulele THP-1 sunt însemănțate în mod obișnuit la 2-3 zile la densitatea de $0,1-0,2 \times 10^6$ celule/ml. Acestea ar trebui să fie menținute la densități cuprinse între 0,1 și $1,0 \times 10^6$ celule/ml. Înainte de a le utiliza pentru testare, celulele ar trebui să fie calificate prin efectuarea unui control de reactivitate. Controlul de reactivitate ar trebui să fie efectuat asupra celulelor folosindu-se martori pozitivi, 2,4-dinitroclorbenzen (DNCB) (CAS nr. 97-00-7, puritate ≥ 99 %) și sulfat de nichel (NiSO₄) (CAS nr. 10101-97-0, puritate ≥ 99 %) și martorul negativ, acidul lactic (AL) (CAS nr. 50-21-5, puritate ≥ 85 %), la două săptămâni după decongelare. Atât DNCB, cât și NiSO₄ ar trebui să genereze un răspuns pozitiv al markerilor celulari de suprafață CD86 și CD54, iar AL ar trebui să genereze un răspuns negativ al markerilor celulari de suprafață CD86 și CD54. Sunt utilizate pentru analiză numai celulele pentru care verificarea de reactivitate a fost efectuată cu succes. Celulele pot fi reproduse până la două luni după decongelare. Numărul de trecere nu ar trebui să depășească 30. Verificarea de reactivitate ar trebui să fie efectuată conform procedurilor descrise la punctele 20-24.
12. În scopul testării, celulele THP-1 sunt însemănțate la o densitate de $0,1 \times 10^6$ celule/ml sau de $0,2 \times 10^6$ celule/ml și cultivate în prealabil în baloane de cultură timp de 72 de ore sau, respectiv, 48 de ore. Este important ca densitatea celulară din balonul de cultură, imediat după perioada de cultivare prealabilă, să fie cât mai consecventă posibil în fiecare experiment (aplicându-se una dintre cele două condiții de cultivare prealabilă descrise mai

sus), deoarece densitatea celulară din balonul de cultură, imediat după cultivarea prealabilă, ar putea afecta expresia CD86/CD54 indusă de alergenii (19). În ziua testării, celulele recoltate din balonul de cultură sunt suspendate din nou în mediu de cultură proaspăt, la 2×10^6 celule/ml. Apoi, celulele sunt distribuite pe o tavă cu fund plat cu 24 de godeuri de 500 μ l (1×10^6 celule/godeu) sau pe o tavă cu fund plat cu 96 de godeuri de 80 μ l ($1,6 \times 10^5$ celule/godeu).

Testul de determinare a dozei

13. Se efectuează *un test de determinare a dozei* pentru determinarea CV75, care este concentrația substanței chimice de testat, în urma căruia să se ajungă la o viabilitate celulară (VC) de 75 % în comparație cu martorul tratat cu solvent/vehicul. Valoarea CV75 este utilizată pentru a determina concentrația substanțelor chimice de testat pentru măsurarea expresiei CD86/CD54 [a se vedea alineatele (20)-(24)].

Pregătirea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

14. Substanțele chimice de testat și substanțele martor se pregătesc în ziua testării. Pentru metoda h-CLAT, substanțele chimice de testat sunt dizolvate sau dispersate în mod stabil [a se vedea, de asemenea, alineatul (4)] în soluție salină sau în mediu ca prime opțiuni de solvent/vehicul sau în dimetil sulfoxid (DMSO, puritate $\geq 99\%$) ca a doua opțiune de solvent/vehicul dacă substanța chimică de testat nu este solubilă sau nu formează dispersii stabile în cei doi solvenți/vehicule anterioare, în concentrații finale de 100 mg/ml (în soluție salină sau în mediu) sau de 500 mg/ml (în DMSO). Se pot utiliza și alți solvenți/vehicule decât cele descrise mai sus în cazul în care se prezintă o justificare științifică suficientă. Ar trebui să se țină seama de stabilitatea substanței chimice de testat în solventul/vehiculul final.
15. Pornind de la soluțiile mamă ale substanțelor de testat de 100 mg/ml (în soluție salină sau medie) sau de 500 mg/ml (în DMSO), ar trebui să fie parcurse următoarele etape de diluare:
 - Pentru soluția salină sau mediu ca solvent/vehicul: Se prepară opt soluții mamă (opt concentrații) cu ajutorul unor diluții în serie duble utilizând solventul/vehiculul aferent. Aceste soluții mamă sunt apoi diluate în continuare de 50 de ori în mediu de cultură (soluții de lucru). În cazul în care concentrația finală în partea superioară, în tava de 1 000 μ g/ml, nu este toxică, concentrația maximă ar trebui să fie determinată din nou prin efectuarea unui nou test de citotoxicitate. Concentrația finală în placă nu ar trebui să depășească 5 000 μ g/ml în cazul substanțelor chimice de testat dizolvate sau dispersate în mod stabil în soluție salină sau în mediu salin.
 - În cazul DMSO ca solvent/vehicul: Se prepară opt soluții mamă (opt concentrații) cu ajutorul unor diluții în serie duble utilizând solventul/vehiculul aferent. Aceste soluții

mamă sunt apoi diluate în continuare de 250 de ori în mediu de cultură (soluții de lucru). Concentrația finală în plăci nu ar trebui să depășească 1 000 $\mu\text{g/ml}$, chiar dacă această concentrație nu este toxică.

Soluțiile de lucru sunt utilizate, în cele din urmă, pentru expunere prin adăugarea unui volum egal de soluție de lucru la volumul suspensiei celulare THP-1 din placă (a se vedea, de asemenea, punctul 17) pentru a obține încă o diluare dublă (de regulă, plaja finală de concentrații de pe placă este de 7,81-1 000 $\mu\text{g/ml}$).

16. Martorul tratat cu solvent/vehicul utilizat în metoda h-CLAT este mediu de cultură [pentru substanțele chimice de testat solubilizate sau dispersate în mod stabil (a se vedea punctul 4 fie în mediu, fie în soluție salină) sau DMSO (pentru substanțe chimice de testat solubilizate sau dispersate în mod stabil în DMSO) testat la o singură concentrație finală în placă de 0,2 %. Acesta este supus aceluiași proces de diluție descris pentru soluțiile de lucru de la punctul 15.

Aplicarea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

17. Mediul de cultură sau soluțiile de lucru descrise la punctele 15 și 16 sunt amestecate 1: 1 (v/v) cu suspensiile de celule preparate pe placa cu fund plat de 24 sau 96 de godeuri (a se vedea punctul 12). Plăcile tratate sunt apoi incubate timp de $24 \pm 0,5$ ore la 37°C în soluție cu 5 % CO_2 . Ar trebui să se acorde o atenție deosebită pentru a se evita evaporarea substanțelor chimice de testat volatile și contaminarea încrucișată între godeuri a substanțelor chimice de testat, de exemplu, prin acoperirea etanșă a plăcilor înainte de incubarea cu substanțele chimice de testat (20).

Colorarea cu iodură de propidiu (IP)

18. După $24 \pm 0,5$ ore de expunere, celulele sunt transferate în eprubete de eșantioane și colectate prin centrifugare. Se îndepărtează supernatantele și se suspendă din nou celulele rămase în 200 μl (în cazul plăcii cu 96 de godeuri) sau în 600 μl (în cazul plăcii cu 24 de godeuri) de soluție salină tamponată cu fosfat conținând 0,1 % albumină din ser bovin (soluție tampon de colorare). Se transferă 200 μl de suspensie celulară pe o placă cu fund rotund de 96 de godeuri (în cazul plăcii cu 96 de godeuri) sau în micro-eprubetă (în cazul unei plăci cu 24 de godeuri) și se spală de două ori într-o cantitate de 200 μl (în cazul plăcii cu 96 de godeuri) sau de 600 μl (în cazul plăcii cu 24 de godeuri) de soluție tampon de colorare. În cele din urmă, celulele sunt suspendate din nou în soluție tampon de colorare (de exemplu, 400 μl) și se adaugă soluție IP (de exemplu, 20 μl) (spre exemplu, concentrația finală a IP este de 0,625 $\mu\text{g/ml}$). Se pot utiliza alți markeri de citotoxicitate, cum ar fi 7-aminoactinomicina D (7-AAD), albastru de tripan sau alții, în cazul în care se poate demonstra că acțiunile de colorare alternative generează rezultate similare, de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare din appendicele 1.2.

Măsurarea citotoxicității prin citometria de flux și estimarea valorii CV75

19. Absorbția IP este analizată utilizând citometria de flux la canalul de acumulare FL-3. Sunt acumulate în total 10 000 de celule vii (IP negativă). Viabilitatea celulară poate fi calculată folosind următoarea ecuație prin programul de analiză citometrică. Atunci când viabilitatea celulară este scăzută, trebuie să se acumuleze până la 30 000 de celule, inclusiv celule moarte. În mod alternativ, pot fi acumulate date timp de un minut după inițierea analizei.

$$\text{Viabilitatea celulară} = \frac{\text{Numărul de celule vii}}{\text{Numărul total de celule acumulate}} \times 100$$

Valoarea CV75 (a se vedea punctul 13), adică o concentrație care indică o rată de 75 % a THP-1 de supraviețuire a celulelor (25 % citotoxicitate), este calculată prin interpolare log-lineară folosind următoarea ecuație:

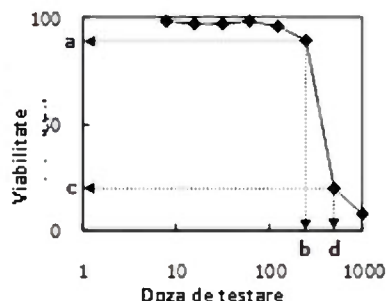
$$\text{Log CV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

Unde:

a reprezintă valoarea minimă a viabilității celulare peste 75 %

c reprezintă valoarea maximă a viabilității celulare sub 75 %

b și d sunt concentrații care arată valoarea viabilității celulare a și, respectiv, c



Se pot utiliza alte abordări pentru derivarea valorii CV75, cu condiția să se demonstreze că acest lucru nu are niciun impact asupra rezultatelor (de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare).

Măsurarea expresiei CD86/CD54

Pregătirea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

20. Solventul/vehiculul corespunzător (soluție salină, medie sau DMSO; a se vedea punctul 14) este utilizat pentru a dizolva sau a dispersa în mod stabil substanțele chimice de testat. Substanțele chimice de testat sunt diluate mai întâi la concentrația corespunzătoare valorii de 100 de ori (pentru soluția salină sau mediu) sau de 500 de ori (pentru DMSO) din $1,2 \times \text{CV75}$, determinate în *testul de determinare a dozei* (a se vedea

punctul 19). În cazul în care valoarea CV75 nu poate fi determinată (și anume, dacă nu se observă un grad suficient de citotoxicitate în *testul de determinare a dozei*), ar trebui utilizată ca și concentrație inițială cea mai mare concentrație solubilă sau dispersată în mod stabil a substanței chimice de testat preparată împreună cu fiecare solvent/vehicul. Concentrația finală în placă nu ar trebui să depășească valoarea de 5 000 µg/ml (în cazul soluției saline sau al mediului) sau de 1 000 µg/ml (în cazul DMSO). Apoi sunt efectuate diluții în serie de 1,2 ori folosind solventul/vehiculul aferent pentru a obține soluțiile mamă [opt concentrații cuprinse între $100 \times 1,2 \times \text{CV75}$ și $100 \times 0,335 \times \text{CV75}$ (în cazul soluției saline sau al mediului) sau între $500 \times 1,2 \times \text{CV75}$ și $500 \times 0,335 \times \text{CV75}$ (în cazul DMSO)] pentru a fi testate prin metoda h-CLAT (a se vedea protocolul DB-ALM nr. 158 pentru un exemplu al schemei de dozare). Soluțiile mamă sunt apoi diluate în continuare de 50 de ori (în cazul soluției saline sau al mediului) sau de 250 de ori (în cazul DMSO) în mediul de cultură (soluțiile de lucru). Aceste soluții de lucru sunt utilizate, în cele din urmă, pentru expunerea la un alt factor final de diluare dublă în placă. În cazul în care rezultatele nu îndeplinesc criteriile de acceptare descrise la punctele 29 și 30 cu privire la viabilitatea celulară, *testul de determinare a dozei* poate fi repetat pentru a determina o valoare CV75 mai exactă. Este de precizat faptul că pot fi utilizate doar plăci cu 24 de godeuri pentru măsurarea expresiei CD86/CD54.

21. Martorul tratat cu solvent/vehicul este preparat astfel cum este descris la punctul 16. Martorul pozitiv utilizat în metoda h-CLAT este DNCB (a se vedea punctul 11), pentru care soluțiile mamă sunt preparate în DMSO și diluate astfel cum este descris în cazul soluțiilor mamă de la punctul 20. DNCB ar trebui utilizat ca martor pozitiv pentru *măsurarea expresiei CD86/CD54* la o concentrație unică finală în placă (de regulă, 4,0 µg/ml). Pentru a obține o concentrație de 4,0 µg/ml a DNCB în placă, se prepară o soluție mamă de 2 mg/ml de DNCB, care este apoi diluată în continuare de 250 de ori în mediu de cultură până la o soluție de lucru de 8 µg/ml. În mod alternativ, valoarea CV75 a DNCB, care este determinată în fiecare instalație de testare, ar putea fi utilizată, de asemenea, ca o concentrație a martorului pozitiv. Ar putea fi utilizați și alți martori pozitivi adecvați în cazul în care sunt disponibile date anterioare pentru a obține criterii comparabile de acceptare a testelor. În cazul martorilor pozitivi, concentrația finală unică în placă nu ar trebui să depășească valoarea de 5 000 µg/ml (în cazul soluției saline sau al mediului) sau de 1 000 µg/ml (în cazul DMSO). Criteriile de acceptare a testelor sunt aceleași cu cele descrise pentru substanța chimică testată (a se vedea punctul 29), cu excepția ultimului criteriu de acceptare, deoarece martorul pozitiv este testat într-o singură concentrație.

Aplicarea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

22. Pentru fiecare substanță chimică de testat și substanță martor este necesar un singur experiment pentru a obține o predicție. Fiecare experiment constă în cel puțin două testări

independente pentru *măsurarea expresiei CD86/CD54* (a se vedea punctele 26-28). Fiecare test independent este efectuat într-o altă zi sau în aceeași zi, cu condiția ca pentru fiecare test: a) să se prepare soluții mamă și soluții de lucru ale substanțelor chimice de testat și ale soluțiilor de anticorpi independente și proaspete și b) să se utilizeze celule recoltate în mod independent (de exemplu, se colectează celule din flacoane de cultură diferite); însă celulele pot proveni din aceeași trecere. Substanțele chimice de testat și substanțele martor preparate ca soluții de lucru (500 μ l) sunt amestecate cu 500 μ l de celule suspendate (1×10^6 celule) la un raport de 1:1, iar celulele sunt incubate timp de $24 \pm 0,5$ ore, conform descrierii de la punctele 20 și 21. În cadrul fiecărui test, o singură replică pentru fiecare concentrație a substanței chimice de testat și a substanței martor este suficientă, deoarece se obține o predicție din cel puțin două teste independente.

Colorarea și analiza celulelor

23. După $24 \pm 0,5$ ore de expunere, celulele sunt transferate din placa de 24 de godeuri în eprubete pentru probe, colectate prin centrifugare și apoi spălate de două ori cu 1 ml de soluție tampon de colorare (dacă este necesar, se pot lua măsuri suplimentare de spălare). După spălare, celulele sunt blocate cu 600 μ l de soluție de blocare [soluție tampon de colorare care conține globulină 0,01 % (g/v) (fracția Cohn fracțiune II, III, umană; SIGMA, #G2388-10G sau echivalentul)] și incubate la 4°C timp de 15 minute. După blocare, celulele sunt împărțite în trei părți alicote de 180 μ l pe o placă de 96 de godeuri cu fund rotund sau în micro-eprubetă.
24. După centrifugare, celulele sunt colorate cu 50 μ l de soluție de anticorpi anti-CD86, anti-CD54 sau de șoarece IgG1 (izotip) etichetată FITC la 4 °C timp de 30 de minute. Anticorpul descriși în protocolul DB-ALM nr. 158 al testului h-CLAT (18) ar trebui să fie utilizați prin diluarea în proporție de 3:25 v/v [pentru CD86 (BD-PharMingen, #555657; Clone: Fun-1)] sau de 3:50 v/v [pentru CD54 (DAKO, #F7143; Clone: 6,5B5) și IgG1 (DAKO, #X0927)] cu soluție tampon de colorare. Acești factori de diluție a anticorpilor au fost definiți de către dezvoltatorii de teste ca fiind cei care asigură cel mai bun raport semnal/zgomot. Pe baza experienței dezvoltatorilor de teste, intensitatea fluorescenței anticorpilor este, de obicei, consecventă între diferite loturi. Cu toate acestea, utilizatorii ar putea avea în vedere titrarea anticorpilor în condițiile din laboratorul propriu pentru a defini cele mai bune concentrații de utilizare. Se pot utiliza și alți anticorpi anti-CD86 marcați cu fluorocrom și/sau anti-CD54 în cazul în care se poate demonstra că aceștia generează rezultate similare cu cele ale anticorpilor conjugați FITC, de exemplu prin testarea substanțelor de verificare din appendicele 1.2. Trebuie remarcat faptul că modificarea clonei sau a furnizorului anticorpilor descriși în protocolul h-CLAT DB-ALM nr. 158 (18) poate afecta rezultatele. După ce sunt spălate de două sau de mai multe ori în 150 μ l de soluție-tampon de colorare, celulele sunt resuspendate în soluție-tampon de colorare (de exemplu, 400 μ l) și se adaugă soluție IP (de exemplu, 20 μ l pentru a obține o

concentrație finală de 0,625 µg/ml) sau o altă soluție a markerului de citotoxicitate (a se vedea punctul 18). Nivelurile de expresie ale CD86 și CD54 și viabilitatea celulară sunt analizate folosind citometria de flux.

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea datelor

25. Expresia CD86 și CD54 este analizată utilizând citometria de flux la canalul de acumulare FL-1. Pe baza intensității medii geometrice a fluorescenței (MFI), intensitatea relativă a fluorescenței (RFI) a CD86 și CD54 pentru celule și celule tratate chimic cu martor (ctrl) pozitiv se calculează conform ecuației următoare:

$$RFI = \frac{MFI \text{ celule tratate cu substanța chimică} - MFI \text{ celule cu martor izotip tratate cu substanța chimică}}{MFI \text{ celule ctrl tratate cu solvent sau vehicul} - MFI \text{ celule ctrl izotip tratate cu solvent sau vehicul}} \times 100$$

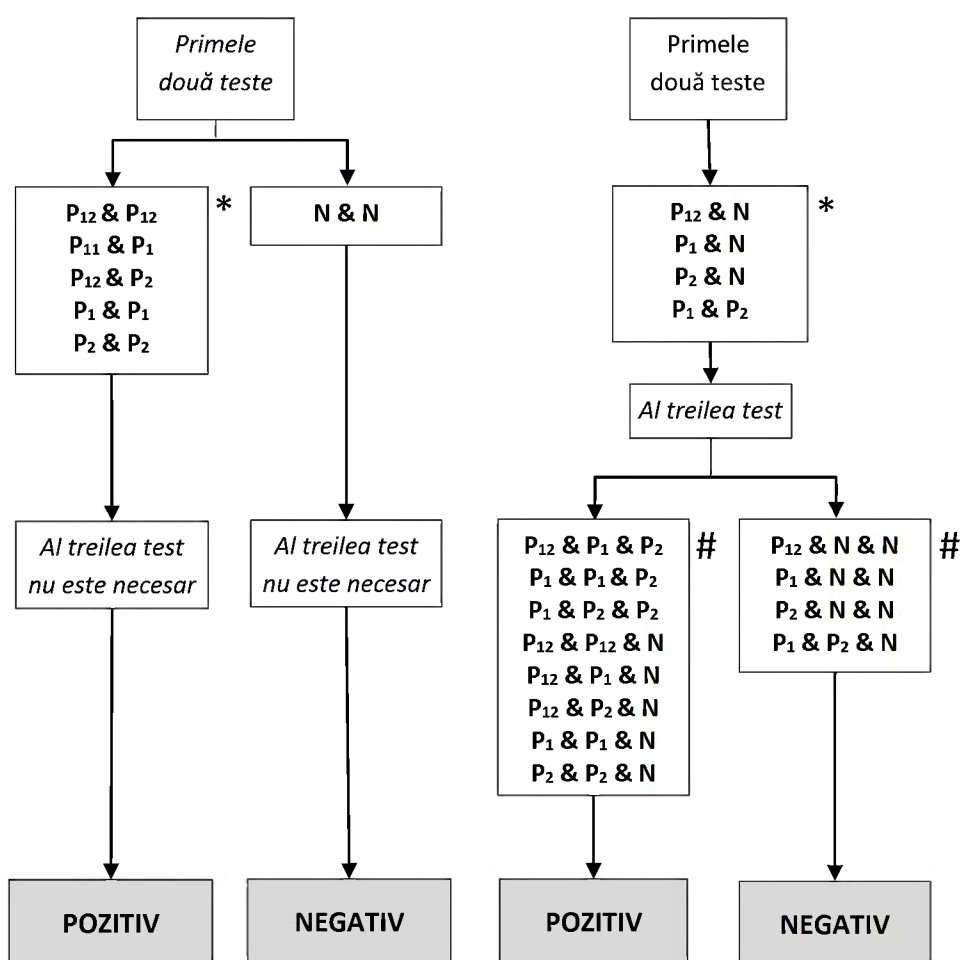
Viabilitatea celulară de la celulele cu martor izotip (ctrl) (care sunt colorate cu anticorpi IgG1 (izotip) de șoarece) este calculată, de asemenea, conform ecuației descrise la punctul 19.

Model predictiv

26. Pentru măsurarea expresiei *CD86/CD54*, fiecare substanță chimică de testat este testată prin cel puțin două teste independente pentru a se obține o singură estimare (POZITIV sau NEGATIV). O estimare h-CLAT este considerată POZITIVĂ dacă este îndeplinită cel puțin una dintre următoarele condiții în cadrul derulării a 2 sau a cel puțin 2 din 3 teste independente; în caz contrar, estimarea h-CLAT este considerată NEGATIVĂ (figura 1):
- Valoarea RFI a CD86 este mai mare sau egală cu 150 % la orice concentrație testată (cu viabilitate celulară ≥ 50 %);
 - Valoarea RFI a CD54 este mai mare sau egală cu 200 % la orice concentrație testată (cu viabilitate celulară ≥ 50 %).
27. Pe baza celor de mai sus, dacă primele două teste generează rezultate pozitive pentru CD86 și/sau rezultate pozitive pentru CD54, estimarea h-CLAT este considerată a fi POZITIVĂ și nu este necesară derularea unui al treilea test. În mod similar, în cazul în care primele două teste sunt negative pentru ambii markeri, estimarea h-CLAT este considerată a fi NEGATIVĂ (ținând seama în mod corespunzător de dispozițiile de la punctul 30), fără a fi necesară derularea unui al treilea test. Însă, dacă rezultatele primelor două teste nu sunt concordante pentru cel puțin unul dintre markeri (CD54 sau CD86), este necesară derularea unui al treilea test, iar estimarea finală va fi bazată pe rezultatul majoritar al celor trei teste individuale (și anume, două din trei). În acest sens, ar trebui remarcat faptul că, dacă sunt derulate două teste independente, iar unul este pozitiv doar pentru CD86 (denumit în continuare „P₁”) și celălalt este pozitiv doar pentru CD54 (denumit în

continuare „P₂”), este necesară derularea unui al treilea test. În cazul în care acest al treilea test este negativ pentru ambii markeri (denumiți în continuare „N”), estimarea h-CLAT este considerată ca fiind NEGATIVĂ. Pe de altă parte, în cazul în care al treilea test este pozitiv pentru oricare dintre markeri (P₁ sau P₂) sau pentru ambii markeri (denumit în continuare „P₁₂”), estimarea h-CLAT este considerată POZITIVĂ.

Figura 1: Model predictiv utilizat în metoda h-CLAT. O estimare h-CLAT ar trebui să fie analizată în cadrul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la punctele 7 și 8 din Introducerea generală.



P₁: test cu estimare pozitivă doar pentru CD86; P₂: test cu estimare pozitivă doar pentru CD54; P₁₂: test cu estimare pozitivă pentru CD86 și CD54; N: test cu estimare pozitivă pentru CD86 sau CD54.

* Casetele prezintă combinațiile relevante ale rezultatelor obținute în cadrul primelor două teste, independent de ordinea în care acestea ar putea fi obținute.

#Casetele prezintă combinațiile relevante ale rezultatelor obținute în cadrul celei trei teste, pe baza rezultatelor obținute în cadrul primelor două teste prezentate în caseta de mai sus, însă nu reflectă ordinea în care acestea ar putea fi obținute.

28. Pentru substanțele chimice de testat estimate ca fiind POZITIVE cu testul h-CLAT, ar putea fi determinate opțional două valori ale concentrațiilor efectivă (CE), CE150 pentru CD86 și CE200 pentru CD54, și anume concentrația la care substanțele chimice de testat au indus o valoare RFI de 150 sau 200. Aceste valori CE ar putea contribui la evaluarea potenței de sensibilizare (9) atunci când sunt utilizate în abordări integrate precum IATA (4) (5) (6) (7) (8). Acestea sunt calculate pe baza ecuațiilor următoare:

$$EC150 \text{ (for CD86)} = B_{conc} + [(150 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC200 \text{ (for CD54)} = B_{conc} + [(200 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

unde

A_{conc} este concentrația cea mai scăzută în $\mu\text{g/ml}$ cu $\text{RFI} > 150$ (CD86) sau 200 (CD54)

B_{conc} este concentrația cea mai ridicată în $\mu\text{g/ml}$ cu $\text{RFI} < 150$ (CD86) sau 200 (CD54)

A_{RFI} este valoarea RFI la concentrația cea mai scăzută cu $\text{RFI} > 150$ (CD86) sau 200 (CD54)

B_{RFI} este valoarea RFI la concentrația cea mai ridicată cu $\text{RFI} > 150$ (CD86) sau 200 (CD54)

Cu scopul de a deriva cu o precizie mai mare valorile CE150 și CE200, se pot solicita trei teste independente pentru *măsurarea expresiei CD86/CD54*. Valorile finale ale CE150 și CE200 sunt determinate apoi ca valoarea mediană a valorilor CE calculate în cadrul celor trei teste independente. Atunci când numai două din trei teste independente îndeplinesc criteriile de pozitivitate (a se vedea punctele 26-27), se adoptă valoarea cea mai mare CE150 sau CE200 dintre cele două valori calculate.

Criterii de acceptare

29. Atunci când este utilizată metoda h-CLAT (22) (27), trebuie să fie îndeplinite următoarele criterii de acceptare.
- Viabilitatea celulară a mediului și a martorilor tratați cu solvenți/vehicule ar trebui să fie mai mare de 90 %.
 - La martorul tratat cu solvent/vehicul, valorile RFI ale CD86 și CD54 nu ar trebui să fie peste criteriile pozitive ($\text{RFI} \geq 150$ % pentru CD86 și $\text{RFI} \geq 200$ % pentru CD54). Valorile RFI ale martorului tratat cu solvent/vehicul se calculează cu ajutorul formulei descrise la punctul 25 [„valoarea IMF a substanței chimice” ar trebui să fie înlocuită cu „valoarea IMF a solventului/vehiculului”, iar „valoarea IMF a solventului/vehiculului” ar trebui să fie înlocuită cu „valoarea IMF a martorului (mediului)”].

- În cazul martorilor pentru mediu și a celor tratați cu solvent/vehicul, raportul IMF al CD86 și CD54 pe martor izotop ar trebui să fie $> 105 \%$.
 - În cazul martorului pozitiv (DNCEB), valorile RFI pentru CD86 și CD54 ar trebui să respecte criteriile pozitive ($RFI \geq 150$ pentru CD86 și $RFI \geq 200$ pentru CD54) și viabilitatea celulară ar trebui să fie mai mare de 50% .
 - Pentru substanța chimică de testat, viabilitatea celulară ar trebui să fie peste 50% în cel puțin patru concentrații verificate în cadrul fiecărui test.
30. Rezultatele negative sunt acceptabile numai pentru substanțele chimice de testat care prezintă o viabilitate celulară mai mică de 90% la cea mai mare concentrație testată (și anume, $1,2 \times CV75$ conform schemei de diluție în serie descrise la punctul 20). În cazul în care viabilitatea celulară la $1,2 \times CV75$ este mai mare sau egală cu 90% , rezultatul negativ ar trebui să fie eliminat. Într-un astfel de caz, se recomandă să se încerce reluarea procesului de selecție a dozei prin repetarea testului pentru determinarea CV75. Ar trebui remarcat faptul că, atunci când se utilizează $5\,000\ \mu\text{g/ml}$ în soluție salină (sau mediu ori alți solvenți/vehicule), $1\,000\ \mu\text{g/ml}$ în DMSO sau concentrația solubilă maximă ca și concentrație de testare maximă a unei substanțe chimice de testat, un rezultat negativ este acceptabil chiar dacă viabilitatea celulară este mai mare de 90% .

Raportul testului

31. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat

Substanța monocomponentă

- Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;
- Aspectul fizic, Log Kow, solubilitatea în apă, solubilitatea DMSO, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există;
- Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;
- Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);
- Concentrația (concentrațiile) testată(e);
- Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;
- Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat.

Substanța multicomponentă, UVCB și amestec

- Caracterizarea, dacă este posibil, de exemplu prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), puritatea, apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante (a se vedea mai sus) ale componentelor, dacă există;
- Aspectul fizic, solubilitatea în apă, solubilitatea DMSO și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există;
- Masa moleculară sau masa moleculară aparentă în cazul amestecurilor/polimerilor cu compoziții cunoscute sau alte informații relevante pentru efectuarea studiului;
- Tratatamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);
- Concentrația (concentrațiile) testată(e);
- Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;
- Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat.

Martori

Martor pozitiv

- Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;
- Aspectul fizic, Log K_{ow} , solubilitatea în apă, solubilitatea DMSO, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există și dacă este cazul;
- Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;
- Tratatamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);
- Concentrația (concentrațiile) testată(e);
- Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;
- Trimitere la rezultatele anterioare ale martorilor pozitivi care demonstrează criterii adecvate de acceptare a testelor, dacă este cazul.

Martor negativ și tratat cu solvent/vehicul

- Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

- Purity, chemical identity of impurities, if and where feasible from a practical point of view etc.;
- Physical aspect, molecular mass and other physico-chemical properties relevant in the case in which are used other controls treated with solvent/vehicle than those mentioned in the Guide for tests and if they exist;
- Conditions of storage and stability, if exist;
- Justification of the choice of solvent/vehicle for each chemical substance to be tested.

Condiții de testare

- Name and address of the sponsor, of the testing facility and of the study director;
- Description of the test used;
- Cell line used, conditions of storage and source of these (for example, installation of where they were obtained);
- Flow cytometry used (for example, model), including the settings of the instruments, globulin, antibodies and cytotoxicity marker used;
- Procedure used to demonstrate the capability of the laboratory to perform the test by testing substances for verification and procedure used to demonstrate the reproducibility of the test over time, for example, previous data on controls and/or previous data on verification of reactivity.

Criterii de acceptare a testului

- Viability of cells, IMF values and RFI obtained with the control solvent/vehicle in comparison with acceptance intervals;
- Viability of cells and RFI values obtained with the positive control in comparison with acceptance intervals;
- Viability of cells of all concentrations tested of the chemical substance to be tested.

Procedura de testare

- Number of tests used;
- Concentrations of the chemical substance to be tested, time of application and of exposure used (if they differ from the recommended ones);
- Duration of exposure (if it is different from the recommended one);
- Description of the evaluation and decision criteria used;
- Description of any modifications of the testing procedure.

Rezultate

- Prezentarea tabelară a datelor, inclusiv a valorilor CV75 (dacă este cazul), a valorilor IMF geometrice individuale, a valorilor RFI, a valorilor de viabilitate celulară, a valorilor CE150/CE200 (dacă este cazul) obținute pentru substanța chimică de testat și pentru martorul pozitiv în cadrul fiecărui test, precum și o indicație privind clasificarea substanței chimice de testat în funcție de modelul predictiv;
- O descriere a oricăror alte observații relevante, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor

- Discutarea rezultatelor obținute cu ajutorul metodei h-CLAT;
- Analiza rezultatelor testului în contextul unei IATA în cazul în care sunt disponibile alte informații relevante.

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767-773.
- (2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428-437.
- (3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Material accesibil la adresa: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318-1332.
- (5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333-1347.
- (6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez 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 potencies. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489-504.
- (7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371-379.
- (8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337-351.

- (9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355-2383.
- (10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* DOI 10.1002/jat.3281.
- (11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150-60.
- (12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Material accesibil la adresa: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>
- (13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Accessible at: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599-609.
- (15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (16) 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.
- (17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for

evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.

- (18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Material accesibil la adresa: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.
- (20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.
- (21) OCDE (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris, Franța, 2005, 96 pp.
- (22) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Publicație disponibilă la adresa: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (23) Organizația Națiunilor Unite ONU (2013). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS). A cincea ediție revizuită. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Publicație disponibilă la adresa: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).
- (25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

Apendicele 1.1

DEFINIȚII

Precizie: Gradul de concordanță între rezultatele testului și valorile de referință acceptate. Aceasta măsoară performanța testului și unul dintre aspectele relevanței acestuia. Termenul este adesea utilizat în mod interschimbabil, iar concordanța înseamnă proporția de rezultate corecte ale unui test (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 molecular declanșator până la un răspuns *in vivo* de interes (22).

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

CV75: Concentrația estimată care indică o viabilitate celulară de 75 %.

EC150: concentrațiile care indică valorile RFI de 150 în expresia CD86

EC200: concentrațiile care indică valorile RFI de 200 în expresia CD54

Citometria de flux: o tehnică citometrică prin care celulele au fost suspendate într-un flux fluid una câte una, printr-o focalizare a luminii care excită și care este difuzată în modele caracteristice asupra celulelor și a componentelor acestora; celulele sunt etichetate frecvent cu markeri fluorescenți, astfel încât lumina să fie absorbită mai întâi și apoi emisă la frecvențe modificate.

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.

Martor pentru mediu: O probă replică netratată care conține toate componentele unui sistem 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/vehiculul interacționează cu sistemul de testare.

Amestec: un amestec sau o soluție compus/ă din două sau mai multe substanțe.

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție 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 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.

Prehaptene: substanțe chimice care devin sensibilizante prin transformări abiotice

Prohaptene: substanțe chimice care necesită activare enzimatică pentru a exercita potențialul de sensibilizare cutanată

Intensitatea relativă a fluorescenței (RFI): Valorile relative ale intensității medii a fluorescenței (MFI) la celulele tratate chimic comparativ cu MFI din celulele tratate cu solvent/vehicul.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include analiza preciziei (a concordanței) unui test (21).

Fiabilitate: Măsurile ale faptului că un test poate fi efectuat în mod reproductibil, în același laborator și în laboratoare diferite în timp, atunci când este efectuat utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau între laboratoare și a repetabilității în același laborator (21).

Test: Un test este compus din unul sau mai multe substanțe chimice de testat, care sunt testate concomitent cu un martor solvent/vehicul și un martor pozitiv.

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect în urma testului. Aceasta permite măsurarea preciziei în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (21).

Soluție tampon de colorare: O soluție salină tamponată cu fosfat conținând o cantitate de 0,1 % albumină din ser bovin.

Martor solvent/vehicul: O probă netratată care conține toate componentele unui sistem de

testare, cu excepția celor ale substanței chimice de testat, dar incluzând solventul/vehiculul utilizat. Acesta este utilizat pentru a stabili reacția de bază pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată sau dispersată stabil în același solvent/vehicul. Atunci când este testată concomitent cu un martor de mediu, această probă indică, de asemenea, dacă solventul/vehiculul interacționează cu sistemul testat.

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect în urma testului. Aceasta permite măsurarea preciziei în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (21).

Substanță: un element chimic și compușii săi în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a-i păstra stabilitatea și orice impuritate care derivă din procesul utilizat, însă excluzând orice 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(ă) în cadrul acestei metode.

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 se referă la 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 (23).

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

Test valabil: Un test considerat a avea suficientă relevanță și fiabilitate pentru un scop specific și care se bazează pe principii solide din punct de vedere științific. Un test nu este niciodată valabil într-un sens absolut, ci doar în legătură cu un scop definit (21).

Apendicele 1.2

SUBSTANȚE DE VERIFICARE

Înainte de utilizarea de rutină a testului descris în prezentul apendice la metoda de testare B.71, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice prin obținerea în mod corect a estimării h-CLAT pentru cele 10 substanțe de verificare recomandate în tabelul 1 și prin obținerea de valori pentru CV75, EC150 și EC200 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 ca substanțele să fie disponibile în comerț și să fie disponibile date de referință *in vivo* de înaltă calitate, precum și date *in vitro* de înaltă calitate generate cu metoda h-CLAT. De asemenea, sunt disponibile date de referință publicate pentru metoda h-CLAT (3) (14).

Tabelul 1: Substanțe recomandate pentru a demonstra performanțele tehnice prin metoda h-CLAT

Substanțe de verificare	NR CAS	Stare fizică	Estimare <i>in vivo</i> ¹	CV75 Interval de referință în μg/ml ²	Rezultate h-CLAT pentru CD86 (Interval de referință pentru EC150 în μg/ml) ²	Rezultate h-CLAT pentru CD54 (Interval de referință pentru EC200 în μg/ml) ²
2,4-dinitroclorbenzen	97-00-7	Solid	Sensibilizant (extrem)	2-12	Pozitiv (0,5-10)	Pozitiv (0,5-15)
4-fenilendiamină	106-50-3	Solid	Sensibilizant (puternic)	5-95	Pozitiv (<40)	Negativ (>1,5) ³
Sulfat de nichel	10101-97-0	Solid	Sensibilizant (moderat)	30-500	Pozitiv (<100)	Pozitiv (10-100)
2-Mercaptobenzotiazol	149-30-4	Solid	Sensibilizant (moderat)	30-400	Negativ (>10) ³	Pozitiv (10-140)
R(+)-Limonen	5989-27-5	Lichid	Sensibilizant (slab)	>20	Negativ (>5) ³	Pozitiv (<250)
Imidazolidinil uree	39236-46-9	Solid	Sensibilizant (slab)	25-100	Pozitiv (20-90)	Pozitiv (20-75)
Izopropanol	67-63-0	Lichid	Non- sensibilizant	>5000	Negativ (>5 000)	Negativ (>5 000)
Glicerină	56-81-5	Lichid	Non- sensibilizant	>5000	Negativ (>5 000)	Negativ (>5 000)
Acid lactic	50-21-5	Lichid	Non- sensibilizant	1500-5000	Negativ (>5 000)	Negativ (>5 000)
Acid 4-aminobenzoic	150-13-0	Solid	Non- sensibilizant	>1000	Negativ (>1 000)	Negativ (>1 000)

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

¹ Pericolul și estimarea (potența) *in vivo* se bazează pe date LLNA (3) (14). Potența *in vivo* este derivată pe baza criteriilor propuse de ECETOC (24).

² Pe baza valorilor istorice observate (13) (25).

³ Din punct de vedere istoric, au fost obținute preponderent rezultate negative pentru acest marker și, prin urmare, este de așteptat, cel mai probabil, un rezultat negativ. Intervalul furnizat a fost stabilit pe baza celor câteva rezultate pozitive istorice observate. În cazul în care se obține un rezultat pozitiv, valoarea CE ar trebui să se încadreze în intervalul de referință raportat.

Apendicele 2

SENSIBILIZAREA CUTANATĂ *IN VITRO*: TESTUL U937 DE ACTIVARE A LINIEI CELULARE (U-SENS™)

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

1. Testul U-SENS™ cuantifică modificarea produsă la nivelul exprimării unui marker celular de suprafață asociat cu procesul de activare a monocitelor și celulelor dendritice (CD) (și anume, CD86), la nivelul liniei celulare umane U937 afectate de limfomul histiocitar în urma expunerii la substanțe sensibilizante (1). Nivelurile de exprimare măsurate ale markerului celular de suprafață CD86 de la nivelul liniei celulare U937 sunt apoi utilizate pentru susținerea diferențierii între sensibilizantele și nesensibilizantele pentru piele.
2. Testul U-SENS™ a fost evaluat în cadrul unui studiu de validare (2) coordonat de L'Oreal și ulterior supus unei evaluări independente inter pares efectuate de Comitetul Consultativ Științific (ESAC) al laboratorului de referință al Uniunii Europene pentru metode alternative la testarea pe animale (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing - EURL ECVAM) (3). Având în vedere toate dovezile disponibile și contribuțiile autorităților de reglementare și ale părților interesate, U-SENS™ a fost recomandat de EURL ECVAM (4) pentru a fi utilizat în cadrul unei IATA în vederea sprijinirii diferențierii între substanțele sensibilizante și cele nesensibilizante în scopul clasificării și etichetării pericolelor. În documentul său de orientare privind raportarea abordărilor structurate ale integrării datelor și ale surselor de informații individuale utilizate în cadrul IATA pentru sensibilizarea pielii, OCDE abordează în prezent o serie de studii de caz care descriu diferite strategii de testare și modele de predicție. Una dintre diferitele abordări definite este bazată pe testul U-SENS (5). În literatura de specialitate (4) (5) (7) sunt prezentate, de asemenea, exemple de utilizare a datelor U-SENS™, în combinație cu alte informații, inclusiv date istorice și actuale valabile despre oameni (6).
3. Testul U-SENS™ s-a dovedit a fi transferabil către laboratoare cu experiență în tehnici de cultură celulară și analiza citometriei de flux. Nivelul de reproductibilitate în estimări, care poate fi preconizat în urma testării, este de ordinul a 90 % și 84 % în același laborator și între laboratoare (8). Rezultatele generate și incluse în studiul de validare (8), precum și în alte studii publicate (1), indică, în general, faptul că, în comparație cu rezultatele LLNA, precizia de deosebire a sensibilizantelor pentru piele (și anume, categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) de substanțele nesensibilizante este de 86 % (N = 166) cu o sensibilitate de 91 % (118/129) și o specificitate de 65 % (24/37). În comparație cu rezultatele umane, precizia de deosebire a sensibilizantelor pentru piele (și anume, categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) de substanțele nesensibilizante este de

77 % (N = 101) cu o sensibilitate de 100 % (58/58) și o specificitate de 47 % (20/43). Există o probabilitate mai mare ca estimările negative false realizate prin U-SENS™, comparativ cu LLNA, să vizeze substanțe chimice care prezintă un nivel scăzut până la moderat de potență de sensibilizare cutanată (și anume, subcategoria 1B din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și nu substanțe chimice care prezintă un nivel ridicat de potență de sensibilizare cutanată (și anume, subcategoria 1A din GHS al ONU/Regulamentul CLP) (1) (8) (9). Coroborate, aceste informații indică utilitatea testului U-SENS™ în ceea ce privește contribuirea la identificarea pericolelor de sensibilizare cutanată. Cu toate acestea, valorile de precizie furnizate în prezentul document pentru U-SENS™ ca test independent sunt doar orientative, întrucât testul ar trebui luat în considerare în combinație cu alte surse de informații în contextul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la alineatele (7) și (8) din Introducerea generală. În plus, la evaluarea metodelor care nu se bazează pe animale pentru sensibilizarea cutanată, ar trebui reținut faptul că este posibil ca testul LLNA și alte teste pe animale să nu reflecte pe deplin situația oamenilor.

4. Pe baza datelor disponibile în prezent, testul U-SENS™ s-a dovedit a fi aplicabil substanțelor chimice de testat (inclusiv ingrediente cosmetice, de exemplu, conservanți, surfactanți, agenți activi, coloranți) care acoperă o varietate de grupe funcționale organice, de proprietăți fizico-chimice, de grade de potență de sensibilizare cutanată (determinate în studii *in vivo*), precum și spectrul de mecanisme de reacție cunoscute a fi asociate cu sensibilizarea cutanată (și anume, acceptorul Michael, formarea bazei Schiff, agentul de transfer pe bază acrilică, reacția de substituție nucleofilă bimoleculară [SN₂] sau reacția de substituție nucleofilă aromatică [SNA_r]) (1) (8) (9) (10). Testul U-SENS™ se aplică substanțelor chimice de testat care sunt solubile sau care formează dispersii stabile (și anume, un coloid sau o suspensie în care substanța chimică de testat nu se sedimentează sau se separă de solvent/vehicul în diferite faze) într-un solvent/vehicul adecvat [a se vedea alineatul (13)]. Substanțele chimice din setul de date, careu au fost raportate ca fiind prehaptenes (și anume, substanțe activate prin oxidare) sau prohaptene (și anume, substanțe care necesită activare enzimatică, de exemplu prin intermediul enzimelor P450), au fost corect estimate prin testul U-SENS™ (1) (10). Substanțele care perturbă membrana pot conduce la rezultate fals pozitive datorită unei creșteri nespecifice a expresiei CD86, întrucât 3 din 7 rezultate fals pozitive aferente clasificării de referință *in vivo* au fost surfactanți (1). Ca atare, rezultatele pozitive obținute cu surfactanți ar trebui să fie luate în considerare cu prudență, iar rezultatele negative cu surfactanți ar putea fi totuși utilizate pentru a sprijini identificarea substanței chimice de testat ca nefiind nesensibilizantă. Substanțele chimice de testat fluorescente pot fi analizate prin testul U-SENS™ (1); cu toate acestea, substanțele chimice de testat fluorescente puternice care emit la aceeași lungime de undă ca și izotiocianatul de fluoresceină (FITC) sau iodura de propidiu (PI) vor interfera cu detecția prin citometria de flux și, astfel, nu pot fi evaluate în mod corect folosind anticorpi conjugați cu FITC (rezultate potențial fals pozitive) sau PI (viabilitatea

nu este măsurabilă). Într-un astfel de caz, se pot folosi alți anticorpi marcați cu fluorocrom sau alți markeri de citotoxicitate, cu condiția să se poată demonstra că acestea oferă rezultate similare celor generate de anticorpii marcați cu FITC sau PI [a se vedea alineatul (18)], de exemplu prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 2.2. Având în vedere cele de mai sus, rezultatele pozitive obținute cu surfactanți și rezultatele negative obținute cu substanțele chimice de testat fluorescente puternic ar trebui interpretate în contextul limitărilor menționate și împreună cu alte surse de informații în cadrul IATA. În cazul în care există dovezi care demonstrează lipsa de aplicabilitate a testului U-SENS™ la alte categorii specifice de substanțe chimice de testat, acestea nu ar trebui utilizate pentru respectivele categorii specifice.

5. Conform descrierii de mai sus, testul U-SENS™ susține diferențierea între sensibilizantele și nesensibilizantele pentru piele. Însă acesta poate contribui, de asemenea, la evaluarea potenței de sensibilizare atunci când este utilizat în abordări integrate precum IATA. Cu toate acestea, se impun studii suplimentare, de preferință pe baza datelor cu privire la oameni, pentru a determina în ce mod ar putea rezultatele U-SENS™ să fundamenteze evaluarea potenței.
6. Definițiile sunt prevăzute în apendicele 2.1.

PRINCIPIUL TESTULUI

7. Testul U-SENS™ reprezintă un test *in vitro* care cuantifică modificările expresiei markerului celular de suprafață la nivelul unei linii celulare umane, celule U937, afectate de limfomul histiocitar în urma expunerii timp de 45 ± 3 ore la substanța chimică de testat. Markerul de suprafață CD86 este un marker tipic de activare U937. CD86 este cunoscut ca fiind o moleculă co-stimulatorie care poate să imite activarea monocitică, jucând un rol esențial în pregătirea de celule de tip T. Modificările expresiei markerului celular de suprafață CD86 se măsoară prin citometria de flux în urma colorării celulelor cu anticorpi etichetați cu izotiocianat de fluoresceină (FITC). De asemenea, măsurarea citotoxicității este efectuată (de exemplu, utilizând PI) în același timp cu scopul de a se evalua dacă se produce o reglare în sus a expresiei markerului celular de suprafață CD86 în cazul concentrațiilor subcitotoxice. Indicele de simulare (IS) al markerului celular de suprafață CD86, în comparație cu martorul tratat cu solvent/vehicul, se calculează și se utilizează în modelul predictiv (a se vedea punctul 19), pentru a susține diferențierea între sensibilizante și nesensibilizante.

DEMONSTRAREA PERFORMANȚEI

8. Înainte de utilizarea de rutină a testului descris în prezentul apendice pentru metoda de testare B.71, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice, utilizând cele 10 substanțe de verificare enumerate în apendicele 2.2, în conformitate cu bunele practici privind metodele *in vitro* (11). În plus, utilizatorii testelor ar trebui să mențină o bază de date istorice generate în urma verificărilor de reactivitate (a se vedea punctul 11) și cu martori pozitivi și tratați cu solvent/vehicul (a se vedea punctele 15-16) și să utilizeze aceste date pentru a confirma faptul că reproductibilitatea testului în laboratorul propriu este asigurată în timp.

PROCEDURA

9. Acest test se bazează pe protocolul nr. 183 al U-SENS™ DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM) (12). Procedurile standard de operare (PSO) ar trebui să fie utilizate la punerea în aplicare și utilizarea testului U-SENS™ în laborator. Se poate utiliza un sistem automat de derulare a testului U-SENS™ dacă se poate demonstra că acesta generează rezultate similare, de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 2.2. Componentele și procedurile principale pentru testul U-SENS™ sunt descrise în continuare.

Pregătirea celulelor

10. Linia celulară umană afectată de limfomul histiocitic, și anume U937 (13), ar trebui să fie utilizată pentru efectuarea testului U-SENS™. Celulele (clona CRL1593.2) ar trebui să fie obținute de la o bancă de celule calificată, cum ar fi American Type Culture Collection.
11. Celulele U937 sunt cultivate la 37 °C în atmosferă de 5 % CO₂ și de umiditate, în mediu RPMI-1640 completat cu 10 % ser fetal de vițel (SFV), 2 mM L-glutamină, 100 de unități/ml de penicilină și 100 μg/ml de streptomycină (mediu complet). Celulele U937 sunt trecute, de regulă, la 2-3 zile la densitatea de 1,5 sau 3 × 10⁵ celule/ml. Densitatea celulară nu ar trebui să depășească 2 × 10⁶ celule/ml, iar viabilitatea celulară măsurată prin excluderea albastrului de tripan ar trebui să fie ≥ 90 % (nu se aplică la prima trecere după decongelare). Înainte de a le utiliza pentru testare, fiecare lot de celule, SFV sau anticorpi ar trebui să fie calificat prin efectuarea unui control de reactivitate. Verificarea de reactivitate a celulelor ar trebui să fie efectuat folosind martorul pozitiv, acidul picril-sulfonic (acid 2,4,6-trinitrobenzensulfonic: TNBS) (CASRN 2508-19-2, puritate de ≥ 99 %) și acidul lactic ca martor negativ (AL) (CASRN 50-21-5, puritate de ≥ 85 %), după cel puțin o săptămână de la decongelare. Pentru verificarea de reactivitate, ar trebui să fie testate șase concentrații finale pentru fiecare dintre cei doi martori (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 μg/ml și AL: 1, 10, 20, 50, 100, 200 μg/ml). TNBS solubilizat în mediu complet ar trebui să producă o reacție a CD86 pozitivă și legată de concentrație (de exemplu, în cazul în care o concentrație pozitivă, CD86 S.I. ≥ 150, este urmată de o

concentrare cu o valoare a CD86 S.I crescută) și AL solubilizat în mediu complet ar trebui să producă o reacție negativă a CD86 (a se vedea punctul 21). Ar trebui utilizat pentru analiză numai lotul de celule pentru care verificarea de reactivitate a fost efectuată cu succes de două ori. Celulele pot fi reproduse până la șapte săptămâni după decongelare. Numărul de trecere nu ar trebui să depășească 21. Verificarea de reactivitate ar trebui să fie efectuată conform procedurilor descrise la punctele 18-22.

12. În scopul testării, celulele U937 sunt înșămânțate la o densitate de 3×10^5 celule/ml sau de 6×10^5 celule/ml și cultivate în prealabil în baloane de cultură pentru două sau, respectiv, o zi. Ar putea fi utilizate alte condiții de cultivare prealabilă decât cele descrise mai sus dacă este asigurată o argumentare științifică suficientă și dacă se poate demonstra că aceasta generează rezultate similare, de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 2.2. În ziua testării, celulele recoltate din balonul de cultură sunt suspendate din nou în mediu de cultură proaspăt, la 5×10^5 celule/ml. Apoi, celulele sunt distribuite pe o placă de 96 de godeuri de 100 μ l cu fund plat (densitate celulară finală de $0,5 \times 10^5$ celule/godeu).

Pregătirea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

13. Evaluarea solubilității este efectuată înainte de testare. În acest scop, substanțele chimice de testat se dizolvă sau se dispersează în mod stabil la o concentrație de 50 mg/ml în mediu complet ca primă opțiune de solvent sau în dimetilsulfoxid (DMSO, puritate de $\geq 99\%$) ca al doilea solvent/vehicul dacă substanța chimică de testat nu este solubilă în solventul/vehiculul ca mediu complet. Pentru testare, substanța chimică de testat este dizolvată într-o concentrație finală de 0,4 mg/ml în mediu complet dacă substanța chimică este solubilă în acest solvent/vehicul. Dacă substanța chimică este solubilă numai în DMSO, aceasta se dizolvă la o concentrație de 50 mg/ml. Se pot utiliza și alți solvenți/vehicule decât cele descrise mai sus în cazul în care se prezintă o justificare științifică suficientă. Ar trebui să se țină seama de stabilitatea substanței chimice de testat în solventul/vehiculul final.
14. Substanțele chimice de testat și substanțele martor se pregătesc în ziua testării. Deoarece nu este efectuat un test de determinare a dozelor, prima dată ar trebui să fie testate șase concentrații finale (1, 10, 20, 50, 100 și 200 μ g/ml) în solventul/vehiculul corespunzător, fie în mediu complet, fie în mediu de 0,4 % DMSO. Pentru testele ulterioare, începând cu o cantitate de 0,4 mg/ml într-un mediu complet sau 50 mg/ml în DMSO, se prepară soluții de substanțe chimice de testat, cel puțin patru soluții de lucru (și anume, cel puțin patru concentrații) folosind solvent/vehicul corespunzător. Soluțiile de lucru sunt, în final, utilizate pentru tratare prin adăugarea unui volum egal de suspensie celulară U937 (a se vedea punctul 11 de mai sus) la volumul de soluție de lucru din placă pentru a obține o diluție suplimentară dublă (12). Concentrațiile (cel puțin patru concentrații) pentru orice

test ulterior sunt alese pe baza rezultatelor individuale ale tuturor testelor anterioare (8). Concentrațiile finale utilizabile sunt de 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 și 200 $\mu\text{g/ml}$. Concentrația finală maximă este de 200 $\mu\text{g/ml}$. În cazul în care se observă o valoare pozitivă a CD86 la 1 $\mu\text{g/ml}$, se evaluează o cantitate de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ pentru a se afla concentrația substanței chimice de testat care nu induce CD86 deasupra pragului pozitiv. Pentru fiecare test, EC150 (concentrația la care o substanță chimică atinge pragul pozitiv al CD86 de 150 %, a se vedea punctul 19) se calculează dacă se observă o reacție sub forma unei concentrații pozitive de tip CD86. În cazul în care substanța chimică de testat induce o reacție pozitivă a CD86 nelegată de concentrație, calcularea EC150 ar putea să nu fie relevantă, astfel cum este descris în protocolul DB-ALM nr. 183 privind U-SENS TM (12). Pentru fiecare test, CV70 (concentrația la care o substanță chimică atinge pragul de citotoxicitate de 70 %, a se vedea punctul 19) se calculează ori de câte ori este posibil (12). Pentru a analiza efectul reacției concentrației în urma creșterii CD86, orice concentrații dintre concentrațiile utilizabile ar trebui alese ca fiind repartizate în mod egal între valoarea EC150 (sau cea mai mare concentrație necitotoxică negativă CD86) și CV70 (sau cea mai mare concentrație admisă, și anume, 200 $\mu\text{g/ml}$). Ar trebui să fie testate minimum patru concentrații pe test și să existe cel puțin două concentrații comune cu testul (testele) anterior (anterioare) pentru comparație.

15. Martorul tratat cu solvent/vehicul și utilizat în testul U-SENS TM este un mediu complet (pentru substanțe chimice de testat solubilizate sau dispersate în mod stabil) (a se vedea punctul 4) sau o soluție de 0,4 % DMSO în mediu complet (pentru substanțe chimice de testat solubilizate sau dispersate în mod stabil în DMSO).
16. Martorul pozitiv utilizat în testul U-SENS TM este TNBS (a se vedea punctul 11), preparat în mediu complet. TNBS ar trebui utilizat ca martor pozitiv pentru măsurarea expresiei CD86 la o concentrație unică finală în placă (50 $\mu\text{g/ml}$) determinând o viabilitate celulară de > 70 %. Pentru a obține o concentrație de 50 $\mu\text{g/ml}$ de TNBS în placă, se prepară o soluție mamă de 1 M (și anume, 293 mg/ml) de TNBS în mediu complet, care este apoi diluată de 2 930 de ori în mediu complet până la o soluție de lucru de 100 $\mu\text{g/ml}$. Acidul lactic (AL, CAS 50-21-5) ar trebui utilizat ca martor negativ în cantitate de 200 $\mu\text{g/ml}$ solubilizat în mediu complet (dintr-o soluție mamă de 0,4 mg/ml). În fiecare placă din cadrul fiecărui test sunt preparate trei replici de martor netratat în mediu complet, martor tratat cu solvent/vehicul, precum și martori negativi și pozitivi (12). Ar putea fi utilizați și alți martori pozitivi adecvați în cazul în care sunt disponibile date anterioare pentru a obține criterii comparabile de acceptare a testelor. Criteriile de acceptare a testului sunt aceleași cu cele descrise pentru substanța chimică de testat (a se vedea punctul 12).

Aplicarea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

17. Martorul tratat cu solvent/vehicul sau soluțiile de lucru descrise la punctele 14-16 sunt amestecate 1:1 (v/v) cu suspensiile de celule preparate pe placa cu fund plat de 96 de godeuri (a se vedea punctul 12). Plăcile tratate sunt apoi incubate timp de 45 ± 3 ore la 37°C în soluție cu 5 % CO_2 . Înainte de incubare, plăcile sunt închise etanș cu membrană semipermeabilă pentru a se evita evaporarea substanțelor chimice de testat volatile și contaminarea încrucișată între celulele tratate cu substanțe chimice de testat (12).

Colorarea celulelor

18. După 45 ± 3 ore de expunere, celulele sunt transferate într-o placă de microtitrare în formă de V și colectate prin centrifugare. Interferența în solubilitate este definită ca fiind cristale sau picături observate la microscop la 45 ± 3 ore după tratament (înainte de colorarea celulelor). Se îndepărtează supernatantele, iar restul celulelor sunt spălate o singură dată cu o soluție salină cu tampon de fosfat (PBS) de 100 μl rece ca gheața conținând 5 % ser fetal de vițel (soluție tampon de colorare). După centrifugare, celulele sunt resuspendate în 100 μl de soluție tampon de colorare și colorate cu 5 μl (de exemplu, 0,25 μg) de anticorpi anti-CD86 etichetați FITC sau IgG1 (izotip) de șoarece la 4°C timp de 30 de minute, departe de lumină. Ar trebui să se utilizeze anticorpii descriși în Protocolul DB-ALM nr. 183 al U-SENS[™] (pentru CD86: clona BD-PharMingen #555657: Fun-1 sau clona Caltag/Invitrogen # MHCD8601: BU63; și pentru IgG1: BD-PharMingen #555748 sau Caltag/Invitrogen # GM4992). Pe baza experienței dezvoltatorilor de teste, intensitatea fluorescenței anticorpilor este, de obicei, consecventă între diferite loturi. Pentru test ar putea fi utilizate alte clone sau alt furnizor de anticorpi pentru care a fost efectuată cu succes verificarea de reactivitate (a se vedea punctul 11). Cu toate acestea, utilizatorii ar putea avea în vedere titrarea anticorpilor în condițiile din laboratorul propriu pentru a defini cea mai bună concentrație de utilizare. Se poate utiliza și un alt sistem de detecție, de exemplu, anticorpi anti-CD86 marcați cu fluorocrom în cazul în care se poate demonstra că aceștia generează rezultate similare cu cele ale anticorpilor conjugați FITC, de exemplu prin testarea substanțelor de verificare din appendicele 2.2. După spălare de două ori în 100 μl de soluție tampon de colorare și o dată în 100 μl PBS rece ca gheața, celulele sunt resuspendate în PBS rece ca gheața (de exemplu, 125 μl pentru probe analizate manual eprubetă cu eprubetă sau 50 μl utilizând o placă cu auto-eșantionare) și se adaugă soluție IP (concentrație finală de 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se pot utiliza alți markeri de citotoxicitate, cum ar fi 7-aminoactinomicina D (7-AAD) sau albastru de tripan, în cazul în care se poate demonstra că acțiunile de colorare alternative generează rezultate similare cu IP, de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare din appendicele 2.2.

Analiza prin citometria de flux

19. Nivelurile de expresie ale CD86 și viabilitatea celulară sunt analizate folosind citometria de flux. Celulele sunt afișate în interiorul unui segment cu puncte având o dimensiune

(FSC) și o granularitate (SSC) stabilite la scara logaritmică pentru a identifica în mod clar populația dintr-un prim grup R1 și a elimina resturile. Pentru fiecare godeu se impune un număr total vizat de 10 000 de celule în grupul (gate) R1. Celulele din același grup R1 sunt afișate pe un segment cu puncte FL3 sau FL4/SSC. Celulele viabile sunt delimitate prin plasarea unui al doilea grup R2 care selectează populația de celule negative de iodură de propidiu (canalul FL3 sau FL4). Viabilitatea celulară poate fi calculată folosind următoarea ecuație prin programul de analiză citometrică. Atunci când viabilitatea celulară este scăzută, ar putea fi acumulate până la 20 000 de celule, inclusiv celule moarte. În mod alternativ, pot fi acumulate date timp de un minut după inițierea analizei.

$$\text{Viabilitatea celulară} = \frac{\text{Numărul de celule vii}}{\text{Numărul total de celule acumulate}} \times 100$$

Apoi se măsoară procentul de celule pozitive FL1 se măsoară între aceste celule viabile grupate sub R2 (în cadrul R1). Expimarea CD86 la suprafața celulei este analizată pe un segment cu puncte FL1/SSC care formează un grup de celule viabile (R2).

Pentru godeurile cu mediu complet/IgG1, markerul de analiză este stabilit în apropierea populației principale, astfel încât martorii tratați cu mediu complet să aibă IgG1 în intervalul-țintă 0,6-0,9 %.

Interferența culorii este definită ca o schimbare a segmentului cu puncte etichetat cu FITC IgG1 (media geometrică IgG1 FL1 S.I. ≥ 150 %).

Indicele de stimulare (S.I.) al CD86 pentru celulele martorilor (netratate sau în soluție de 0,4 % DMSO) și celulele tratate chimic se calculează conform ecuației următoare:

$$S.I. = \frac{\% \text{ din } CD86^{+} \text{ celule tratate} - \% \text{ din } IgG1^{+} \text{ celule tratate}}{\% \text{ din } CD86^{+} \text{ celule martori} - \% \text{ din } IgG1^{+} \text{ celule martori}} \times 100$$

% din celulele netratate ale martorilor IgG1⁺: denumit drept procent din celulele IgG1 pozitive FL1 definite cu markerul de analiză (interval acceptat de $\geq 0,6$ % și $< 1,5$ %, a se vedea punctul 22) în celulele viabile netratate.

% din celulele tratate/ale martorilor IgG1⁺/CD86⁺: denumit drept procent din celulele IgG1 pozitive FL1/CD86 măsurate fără deplasarea markerului de analiză între celulele viabile ale martorilor/tratate.

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea datelor

20. În testul U-SENS TM se calculează următorii parametri: valoarea CV70, adică o concentrație care indică 70 % din supraviețuirea celulelor U937 (30 % citotoxicitate) și

valoarea EC150, și anume, concentrația la care substanțele chimice de testat au indus un indice de stimulare (S.I.) de 150 % pentru CD86.

CV70 se calculează prin interpolare logliniară folosind următoarea ecuație:

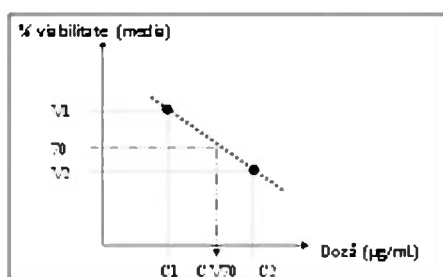
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

Unde:

V1 reprezintă valoarea minimă a viabilității celulare peste 70 %

V2 reprezintă valoarea maximă a viabilității celulare sub 70 %

C1 și C2 sunt concentrații care arată valoarea viabilității celulare V1 și, respectiv, V2



Se pot utiliza alte abordări pentru derivarea valorii CV70, cu condiția să se demonstreze că acest lucru nu are niciun impact asupra rezultatelor (de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare).

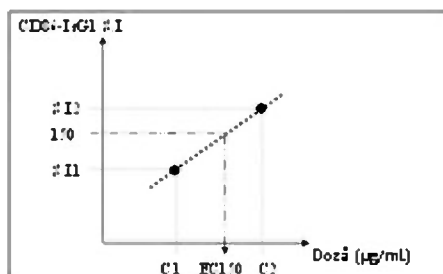
EC150 se calculează prin interpolare logliniară folosind următoarea ecuație:

$$EC150 = C1 + [(150 - S.I.1) / (S.I.2 - S.I.1) * (C2 - C1)]$$

Unde:

C2 este cea mai mare concentrație în µg/ml cu S.I. al CD86 < 150 % (S.I. 1)

C2 este cea mai redusă concentrație în µg/ml cu S.I. al CD86 ≥ 150 % (S.I. 2).



Se calculează valorile EC150 și CV70

- pentru fiecare test: valorile EC150 și CV70 individuale sunt utilizate ca instrumente de investigare a efectului reacției concentrației generate de creșterea CD86 (a se vedea punctul 14),
- valoarea totală a CV70 este determinată pe baza valorilor viabilității medii (12),
- valoarea totală a EC150 este determinată pe baza valorii medii a S.I. al valorilor CD86 pentru substanța chimică de testat prevăzută ca fiind POZITIVĂ în urma testului U-SENSTM (a se vedea punctul 21) (12).

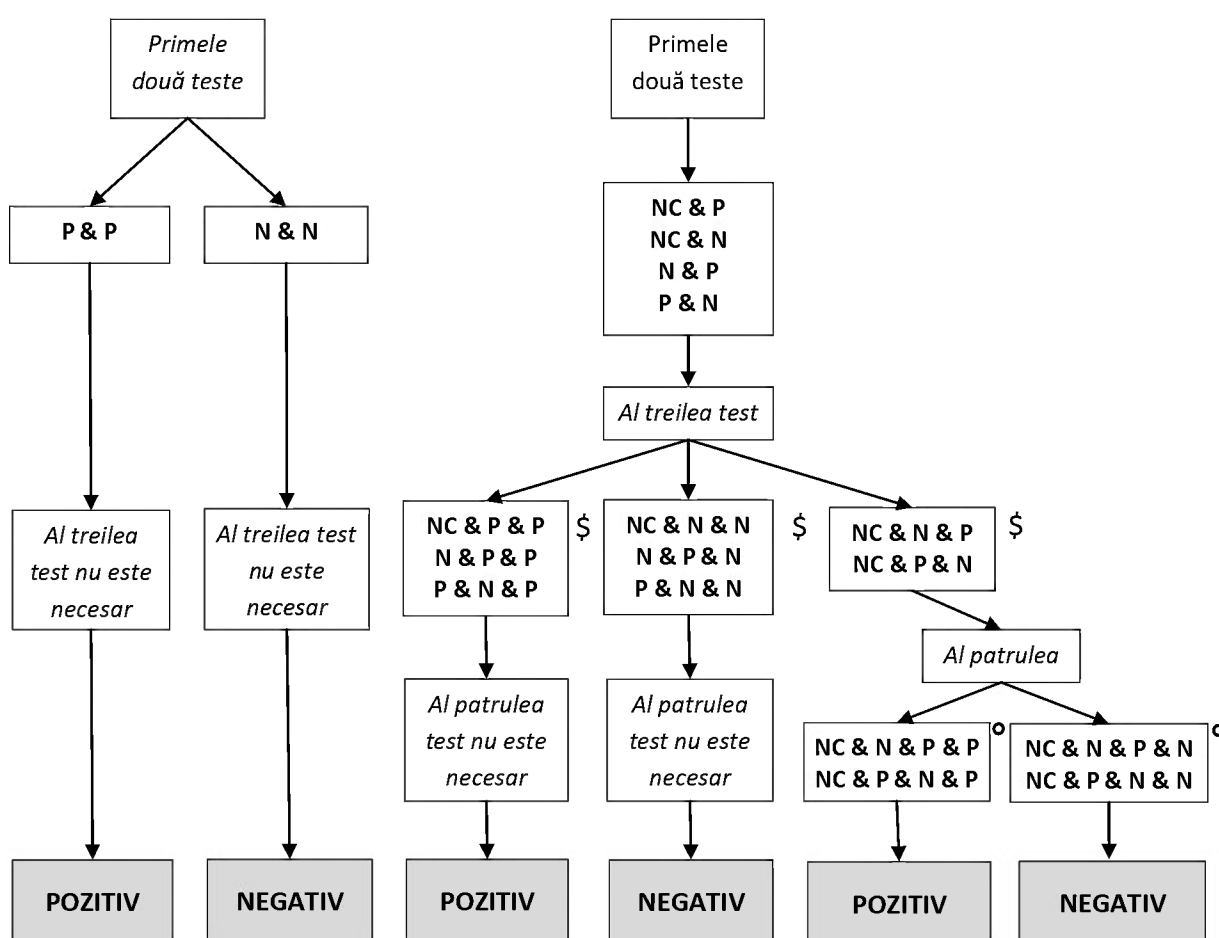
Model predictiv

21. Pentru măsurarea expresiei CD86, fiecare substanță chimică de testat este testată în cel puțin patru concentrații și prin cel puțin două teste independente (efectuate în zile diferite) pentru a se obține o singură estimare (NEGATIV sau POZITIV).

- Concluzia individuală a unui test U-SENSTM este considerată negativă (denumită în continuare „N”) dacă S.I. al CD86 este mai mic de 150 % la toate concentrațiile care nu sunt citotoxice (viabilitate celulară $\geq 70\%$) și dacă nu se observă interferențe (citotoxicitate, solubilitate: a se vedea punctul 18 sau culoarea: a se vedea punctul 19 indiferent de concentrațiile care nu sunt citotoxice la care este detectată interferența). În toate celelalte cazuri: atunci când S.I. al CD86 este mai mare sau egal cu 150 % și/sau se observă interferențe, concluzia individuală a unui test U-SENSTM este considerată pozitivă (denumită în continuare „P”).
- O estimare în urma unui test U-SENSTM este considerată NEGATIVĂ dacă cel puțin două teste independente sunt negative (N) (figura 1). Dacă primele două teste sunt ambele negative (N), estimarea U-SENSTM este considerată NEGATIVĂ și nu trebuie să fie efectuat un al treilea test.
- O estimare în urma unui test U-SENSTM este considerată POZITIVĂ dacă cel puțin două teste independente sunt pozitive (P) (figura 1). Dacă primele două teste sunt ambele pozitive (P), estimarea U-SENSTM este considerată POZITIVĂ și nu trebuie să fie efectuat un al treilea test.
- Deoarece nu este efectuată o analiză pentru determinarea dozelor, există o excepție în cazul în care, în cadrul primului test, S.I. al CD86 este mai mare sau egal cu 150 % doar la cea mai mare concentrație care nu este citotoxică. Atunci testul este considerat a fi NECONCLUDENT (NC) și ar trebui să se testeze concentrații suplimentare (între cea mai mare concentrație fără citotoxicitate și cea mai scăzută concentrația cu citotoxicitate - a se vedea punctul 20) în cadrul unor teste suplimentare. În cazul în care un test este identificat ca fiind NC, ar trebui să fie efectuate cel puțin încă două teste, precum și un al patrulea test în cazul în care al doilea și al treilea test nu sunt concordante (N și/sau P independent) (figura 1). Testele efectuate în continuare vor fi considerate pozitive chiar dacă numai în

cazul unei concentrații care nu este citotoxică este generată o valoare a CD86 egală cu sau peste 150 %, deoarece valoarea concentrației a fost ajustată pentru substanța chimică de testat specifică. Estimarea finală va fi bazată pe rezultatul majoritar al celor trei sau patru teste individuale (și anume: două din trei sau două din patru) (figura 1).

Figura 1: Model predictiv utilizat în testul U-SENS™. O estimare U-SENS™ ar trebui să fie analizată în cadrul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la punctul 4 și de la punctele 7, 8 și 9 din Introducerea generală.



N: Test fără o valoare pozitivă a CD86 sau observarea unei interferențe;

P: Test cu o valoare pozitivă a CD86 și/sau cu observarea unei (unor) interferențe;

NC: Neconcludent. Primul test fără concluzii atunci când valoarea CD86 este pozitivă numai la cea mai mare concentrație necitotoxică;

#: O concluzie individuală de tipul Neconcludent (NC), care este atribuită numai primului test efectuat determină în mod automat necesitatea efectuării unui al treilea test pentru a ajunge la o majoritate a concluziilor de tip Pozitiv (P) sau Negativ (N) în cadrul a cel puțin două din trei teste independente.

\$: Casetele prezintă combinațiile relevante ale rezultatelor obținute în cadrul celei trei teste, pe baza rezultatelor obținute în cadrul primelor două teste prezentate în caseta de mai sus.

°: Casetele prezintă combinațiile relevante ale rezultatelor obținute în cadrul celei patru teste, pe baza rezultatelor obținute în cadrul primelor trei teste prezentate în caseta de mai sus.

Criterii de acceptare

22. Atunci când este utilizat testul U-SENS™ (12), ar trebui să fie îndeplinite următoarele criterii de acceptare.

- La sfârșitul perioadei de expunere de 45 ± 3 ore, viabilitatea medie a celulelor U937 netratate triple trebuia să fie $> 90 \%$ și nu se observă nicio deviere a expresiei CD86. Expresia de bază a valorii CD86 a celulelor U937 netratate a trebuit să fie cuprinsă între $\geq 2 \%$ și $\leq 25 \%$.
- În cazul în care DMSO este utilizat ca solvent, valabilitatea martorului tratat cu vehicul DMSO este evaluată prin calcularea unui S.I. al DMSO în raport cu celulele netratate, iar viabilitatea medie a celulelor triple a trebuit să fie $> 90 \%$. Martorul tratat cu vehicul DMSO este valabil dacă valoarea medie a S.I. triplu al CD86 a fost sub 250% din valoarea medie a S.I. al valorii CD86 a celulelor U937 netratate.
- Testele sunt considerate valabile dacă cel puțin două din trei valori IgG1 ale celulelor U937 netratate s-au încadrat între $\geq 0,6 \%$ și $< 1,5 \%$.
- Martorul negativ testat în paralel (acidul lactic) este considerat valabil dacă cel puțin două din cele trei replici au fost negative (CD86 S.I. $< 150 \%$) și fără citotoxicitate (viabilitate celulară $\geq 70 \%$).
- Martorul pozitiv (TNBS) a fost considerat valabil dacă cel puțin două din cele trei replici au fost pozitive (CD86 S.I. $< 150 \%$) și fără citotoxicitate (viabilitate celulară $\geq 70 \%$).

Raportul testului

23. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanță chimică de testat

Substanța monocomponentă

- Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;
- aspectul fizic, solubilitate în mediu complet, solubilitate în DMSO, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există;

- Purity, chemical identity of impurities, where appropriate and if feasible from a practical point of view etc.;
- Treatment before the test, where appropriate (for example, heating, grinding);
- Concentration (concentrations) tested(e);
- Conditions of storage and stability, where appropriate;
- Justification of the choice of solvent/vehicle for each chemical substance tested.

Substanța multicomponentă, UVCB și amestec:

- Characterization, where possible, for example by chemical identity (as seen above), purity, quantitative appearance and physico-chemical properties relevant (as seen above) of the components, where appropriate;
- physical aspect, solubility in a complete medium, solubility in DMSO and other physico-chemical properties relevant, where appropriate;
- Molecular mass or apparent molecular mass in the case of mixtures/polymers with composition known or other relevant information for the test;
- Treatment before the test, where appropriate (for example, heating, grinding);
- Concentration (concentrations) tested(e);
- Conditions of storage and stability, where appropriate;
- Justification of the choice of solvent/vehicle for each chemical substance tested.

Martori

Martor pozitiv

- Chemical identification, such as name (names) IUPAC or CAS, number (numbers) SMILES or InChI code, structural formula and/or other identifiers;
- physical aspect, solubility in DMSO, molecular mass and other physico-chemical properties relevant, in the measure in which it is possible and if appropriate;
- Purity, chemical identity of impurities, where appropriate and if feasible from a practical point of view etc.;
- Treatment before the test, where appropriate (for example, heating, grinding);
- Concentration (concentrations) tested(e);

- Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;
- Trimitere la rezultatele anterioare ale martorilor pozitivi care demonstrează criterii adecvate de acceptare a testelor, dacă este cazul.

Martor negativ și tratat cu solvent/vehicul

- Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;
- Purity, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;
- Aspectul fizic, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante în cazul în care sunt utilizați alți martori tratați cu solvent/vehicul decât cei menționați în Ghidul pentru teste și dacă aceștia există;
- Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;
- Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat.

Condiții de testare

- Numele și adresa sponsorului, ale instalației de testare și ale directorului de studiu;
- descrierea testului utilizat;
- Linia celulară utilizată, condițiile de depozitare și sursa acestuia (de exemplu, instalația de la au fost obținute acestea);
- citometria de flux utilizată (de exemplu, modelul), inclusiv reglajele instrumentelor, anticorpii și markerul de citotoxicitate utilizat;
- Procedura utilizată pentru a demonstra capabilitatea laboratorului de a efectua testul prin testarea unor substanțe de verificare și procedura utilizată pentru a demonstra performanța reproductibilă a testului în timp, de exemplu, datele anterioare privind martorii și/sau datele anterioare privind verificările asupra reactivității.

Criterii de acceptare a testului

- viabilitatea celulară valorile S.I. ale CD86 obținute cu martorul tratat cu solvent/vehicul în comparație cu intervalele de acceptare;
- viabilitatea celulară și valorile S.I. obținute cu martorul pozitiv în comparație cu intervalele de acceptare;
- Viabilitatea celulară a tuturor concentrațiilor testate ale substanței chimice de testat.

Procedura de testare

- Numărul de teste utilizate;
- Concentrațiile substanței chimice de testat, timpul de aplicare și de expunere utilizat (dacă acestea diferă de cele recomandate)
- Durata expunerii;
- Descrierea criteriilor de evaluare și de decizie utilizate;
- Descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare.

Rezultate

- Prezentarea tabelară a datelor, inclusiv a valorilor CV70 (dacă este cazul), a valorilor de viabilitate celulară, a valorilor CE150 (dacă este cazul) obținute pentru substanța chimică de testat și pentru martorul pozitiv în cadrul fiecărui test, precum și o indicație privind clasificarea substanței chimice de testat în funcție de modelul predictiv;
- O descriere a oricăror alte observații relevante, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor

- Discutarea rezultatelor obținute în urma testului U-SENS™;
- Analiza rezultatelor testului în contextul unei IATA în cazul în care sunt disponibile alte informații relevante.

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.
- (2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Material accesibil la adresa:
http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations
- (3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28178 EN; doi 10.2787/815737. Publicație disponibilă la adresa:
[\[http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705\]](http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705).
- (4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28553 EN; doi 10.2760/588955. Publicație disponibilă la adresa:
<https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
- (5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
- (6) OCDE (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa:
[\http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.
- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.

- (8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.
- (9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehn, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.
- (10) 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, 1683-1696.
- (11) OCDE. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.
- (12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Material accesibil la adresa: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].
- (13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.
- (14) OCDE (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) Organizația Națiunilor Unite ONU (2015). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, a șasea ediție revizuită, New York & Geneva: United Nations Publications. Publicație disponibilă la adresa: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (16) OCDE (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to

Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.

- (17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Bruxelles. Publicație disponibilă la adresa: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Apendicele 2.1

DEFINIȚII

Precizie: Gradul de concordanță între rezultatele testului și valorile de referință acceptate. Aceasta măsoară performanța testului și unul dintre aspectele relevanței acestuia. Termenul este adesea utilizat în mod interschimbabil, iar concordanța înseamnă proporția de rezultate corecte ale unui test (14).

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 molecular declanșator până la un răspuns *in vivo* de interes (15).

Reacția concentrației CD86: Există o dependență de concentrație (sau o reacție a concentrației) atunci când o concentrație pozitivă (CD86 S.I. ≥ 150) este urmată de o concentrație cu o valoare S.I. a CD86 în creștere.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

CV70: Concentrația estimată care indică o viabilitate celulară de 70%.

Deviere: O deviere este definită prin următoarele situații: i) valoarea % corectată a CD86⁺ a celei de a treia replici a matorului netratat este mai mică decât 50 % din media valorii % corectate a CD86⁺ a primei și celei de a doua replici ale matorului netratat; și ii) valoarea % corectată a CD86⁺ a celei de a treia replici a matorului negativ este mai mică decât 50 % din media valorii % corectate a CD86⁺ a primei și celei de a doua replici ale matorului negativ.

EC150: concentrațiile estimate care arată S.I. de 150 % al expresiei CD86.

Citometria de flux: o tehnică citometrică prin care celulele au fost suspendate într-un flux fluid una câte una, printr-o focalizare a luminii care excită și care este difuzată în modele caracteristice asupra celulelor și a componentelor acestora; celulele sunt etichetate frecvent cu markeri fluorescenți, astfel încât lumina să fie absorbită mai întâi și apoi emisă la frecvențe modificate.

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.

Amestec: un amestec sau o soluție compus/ă din două sau mai multe substanțe.

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție 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 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.

Prehaptene: substanțe chimice care devin sensibilizante prin transformări abiotice, de exemplu, prin oxidare.

Prohaptene: substanțe chimice care necesită activare enzimatică pentru a exercita potențialul de sensibilizare cutanată.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include analiza preciziei (a concordanței) unui test (14).

Fiabilitate: Măsurile ale faptului că un test poate fi efectuat în mod reproductibil, în același laborator și în laboratoare diferite în timp, atunci când este efectuat utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau între laboratoare și a repetabilității în același laborator (14).

Test: Un test este compus din unul sau mai multe substanțe chimice de testat, care sunt testate concomitent cu un martor solvent/vehicul și un martor pozitiv.

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect în urma testului. Aceasta permite măsurarea preciziei în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (14).

S.I.: Indice de stimulare. Valorile relative ale intensității medii a fluorescenței la celulele tratate chimic comparativ cu celulele tratate cu solvent/vehicul.

Martor solvent/vehicul: O probă netratată care conține toate componentele unui sistem de testare, cu excepția celor ale substanței chimice de testat, dar incluzând solventul/vehiculul utilizat. Acesta este utilizat pentru a stabili reacția de bază pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată sau dispersată stabil în același solvent/vehicul. Atunci când este testată concomitent cu un martor de mediu, această probă indică, de asemenea, dacă solventul/vehiculul interacționează cu sistemul testat.

Specificitate: Proportia tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect în urma testului. Aceasta permite măsurarea preciziei în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (14).

Soluție tampon de colorare: O soluție salină tamponată cu fosfat conținând o cantitate de 5% ser fetal de vițel.

Substanță: un element chimic și compușii săi în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a-i păstra stabilitatea și orice impuritate care derivă din procesul utilizat, însă excluzând orice 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(ă) în cadrul acestui test.

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) pe tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pentru sănătate și pentru mediu, și care vizează elemente de comunicare corespunzătoare, de exemplu pictograme, cuvinte de semnalizare, fraze de pericol, fraze de precauție și fișe cu date de securitate, pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora, în scopul protejării populației (inclusiv a angajatorilor, a lucrătorilor, a transportatorilor, a consumatorilor și a serviciilor de urgență) și a mediului (16).

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

Test valabil: Un test considerat a avea suficientă relevanță și fiabilitate pentru un scop specific și care se bazează pe principii solide din punct de vedere științific. Un test nu este niciodată valabil într-un sens absolut, ci doar în legătură cu un scop definit (14).

Apendicele 2.2

SUBSTANȚE DE VERIFICARE

Înainte de utilizarea de rutină a testului descris în prezentul apendice la metoda de testare B.71, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice prin obținerea în mod corect a estimării U-SENS™ pentru cele 10 substanțe de verificare recomandate în tabelul 1 și prin obținerea de valori pentru CV70 și EC150 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 ca substanțele să fie disponibile în comerț și să fie disponibile date de referință *in vivo* de înaltă calitate, precum și date *in vitro* de înaltă calitate generate cu testul U-SENS™. De asemenea, sunt disponibile date de referință publicate pentru testul U-SENS™ (1) (8).

Tabelul 1: Substanțe recomandate pentru a demonstra performanțele tehnice cu testul U-SENS™

Substanțe de verificare	NR CAS	Stare fizică	Estimare <i>in vivo</i> ¹	U-SENS™ Solvent/ Vehicul	U-SENS™ CV70 Interval de referință în µg/ml ²	U-SENS™ Interval de referință pentru EC150 în µg/ml ²
4-fenilendiamină	106-50-3	Solid	Sensibilizant (puternic)	Mediu complet ³	< 30	Pozitiv (≤ 10)
Acid picril-sulfonic	2508-19-2	Lichid	Sensibilizant (puternic)	Mediu complet	>50	Pozitiv (≤ 50)
Maleat de dietil	141-05-9	Lichid	Sensibilizant (moderat)	DMSO	10-100	Pozitiv (≤ 20)
Rezorcinol	108-46-3	Solid	Sensibilizant (moderat)	Mediu complet	>100	Pozitiv (≤ 50)
Alcool cinamic	104-54-1	Solid	Sensibilizant (slab)	DMSO	>100	Pozitiv (10-100)
4-alilanol	140-67-0	Lichid	Sensibilizant (slab)	DMSO	>100	Pozitiv (<200)
Zaharină	81-07-2	Solid	Non-sensibilizant	DMSO	>200	Negativ (> 200)
Glicerină	56-81-5	Lichid	Non-sensibilizant	Mediu complet	>200	Negativ (> 200)
Acid lactic	50-21-5	Lichid	Non-sensibilizant	Mediu complet	>200	Negativ (> 200)
Acid salicilic	69-72-7	Solid	Non-sensibilizant	DMSO	>200	Negativ (> 200)

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

¹ Pericolul și estimarea (potența) *in vivo* se bazează pe date LLNA (1) (8). Potența *in vivo* este derivată pe baza criteriilor

propuse de ECETOC (17).

² Pe baza valorilor istorice observate (1) (8).

³ Mediu complet: Mediu RPMI-1640 completat cu 10 % ser fetal de vițel, 2 mM L-glutamină, 100 unități/ml penicilină și 100 μg/ml de streptomicină (8).

Apendicele 3

SENSIBILIZARE CUTANATĂ *IN VITRO*: TESTUL IL-8 LUC

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

1. Spre deosebire de testele care analizează expresia markerilor celulari de suprafață, testul IL-8-Luc cuantifică modificările expresiei IL-8, o citocină asociată activării celulelor dendritice (CD). În linia celulară raportoare de tip IL-8 derivată din THP-1 (THP-G8, determinată pornind de la linia celulară monocitică acută la om afectată de leucemie THP-1), expresia IL-8 se măsoară în urma expunerii la substanțe sensibilizante (1). Expresia luciferazei este utilizată apoi pentru a contribui la diferențierea între sensibilizantele și nesensibilizantele pentru piele.
2. Testul IL-8 Luc a fost evaluat în cadrul unui studiu de validare (2) realizat de Centrul Japonez pentru Validarea Metodelor Alternative (Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods - JaCVAM), **Ministerul economiei, comerțului și industriei (METI)** și Societatea Japoneză **pentru Metode Alternative la Testarea pe Animale (JSAAE)** și, ulterior, supus unei evaluări inter pares independente desfășurate sub auspiciile JaCVAM (3) și ale Ministerului Sănătății, Muncii și Bunăstării (MHLW) cu sprijinul **International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM)**. Având în vedere toate dovezile disponibile și contribuțiile autorităților de reglementare și ale părților interesate, testul IL-8 Luc este considerat util în cadrul unei IATA pentru a diferenția substanțele sensibilizante de cele nesensibilizante în scopul clasificării și etichetării pericolelor. Exemple privind utilizarea datelor din cadrul testului IL-8 Luc în combinație cu alte informații sunt prezentate în referințe bibliografice (4) (5) (6).
3. Testul IL-8 Luc s-a dovedit a fi transmisibil la laboratoare cu experiență în cultura celulelor și măsurarea luciferazei. În cadrul aceluiași laborator și între laboratoare ratele de reproductibilitate au fost de 87,7 % și, respectiv, 87,5 % (2). Datele generate în cadrul studiului de validare (2) și alte lucrări publicate (1) (6) arată că, în comparație cu LLNA, prin testul IL-8 Luc un număr de 118 din 143 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind pozitive sau negative, iar 25 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind neconcludente; precizia testului IL-8 Luc privind distincția între sensibilizantele pentru piele (categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și nesensibilizantele pentru piele (neîncadrate într-o categorie din GHS al ONU/Regulamentului CLP) este de 86 % (101/118) cu o sensibilitate de 96 % (92/96) și o specificitate de 41 % (9/22). Cu excepția substanțelor din afara domeniului de aplicabilitate descris mai jos (punctul 5), un număr de 113 din 136 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind pozitive sau negative prin testul IL-8 Luc, iar 23 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind neconcludente; precizia testului IL-8 Luc

este de 89 % (101/113), sensibilitatea de 96 % (92/96) și specificitatea de 53 % (9/17). Folosind datele despre oameni citate în Urbisch et al. (7), prin testul IL-8 Luc un număr de 76 din 90 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind pozitive sau negative, iar 14 substanțe chimice au fost estimate ca fiind neconcludente; precizia este de 80 % (61/76), sensibilitatea de 93 % (54/58) și specificitatea de 39 % (7/18). Cu excepția substanțelor din afara domeniului de aplicabilitate, un număr de 71 din 84 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind pozitive sau negative prin testul IL-8 Luc, iar 13 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind neconcludente; precizia este de 86 % (61/71), sensibilitatea de 93 % (54/58) și specificitatea de 54 % (7/13). Există o probabilitate mai mare să apară estimări negative false în urma testului IL-8 Luc în cazul substanțelor chimice care prezintă un nivel scăzut/moderat de potență de sensibilizare cutanată (subcategoria 1A din GHS al ONU/Regulamentul CLP) (6). Împreună, informațiile sprijină rolul testului IL-8 Luc în ceea ce privește identificarea pericolelor de sensibilizare a pielii. Valoarea preciziei furnizate pentru testul IL-8 Luc ca și test independent este doar orientativă, întrucât testul ar trebui luat în considerare în combinație cu alte surse de informații în contextul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la alineatele (7) și (8) din Introducerea generală. În plus, la evaluarea testelor care nu se bazează pe animale pentru sensibilizarea cutanată, ar trebui reținut faptul că este posibil ca testul LLNA și alte teste pe animale să nu reflecte pe deplin situația oamenilor.

4. Pe baza datelor disponibile, testul IL-8 Luc 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 stabilit în cadrul studiilor *in vivo*), precum și proprietăți fizico-chimice (2) (6).
5. Deși testul IL-8 Luc utilizează X-VIVO™ 15 ca și solvent, prin acesta au fost evaluate în mod corect substanțele chimice având $\text{Log } K_{ow} > 3,5$, precum și cele având o solubilitate în apă de aproximativ 100 µg/ml, astfel cum a fost calculată prin EPI Suite™, iar performanța acestuia de a detecta sensibilizantele cu o solubilitate mai scăzută în apă este mai bună decât a testului IL-8 Luc în care se utilizează dimetilsulfoxid (DMSO) ca și solvent (2). Însă rezultatele negative obținute în cazul substanțelor chimice de testat care nu se dizolvă în 20 mg/ml pot produce rezultate negative false din cauza incapacității acestora de a se dizolva în X-VIVO™ 15. Prin urmare, nu ar trebui să se ia în considerare rezultatele negative în cazul acestor substanțe chimice. În cadrul studiului de validare a fost observată o rată ridicată de rezultate negative false în cazul anhidridelor. În plus, din cauza capacității metabolice limitate a liniei celulare (8) și a condițiilor experimentale, este posibil ca prohaptenele (substanțe care necesită activare metabolică) și prehaptenele (substanțe activate prin oxidare cu aer) să genereze rezultate negative în cadrul testului. Cu toate acestea, deși rezultatele negative pentru prehaptene/prohaptene ar trebui să fie interpretate cu prudență, prin testul IL-8 Luc 11 din 11 prehaptene, 6/6 prohaptene și

6/8 prehaptene/prohaptene au fost estimate corect în cadrul setului de date pentru IL-8 Luc (2). Pe baza revizuirii cuprinzătoare efectuate recent asupra a trei teste care nu se bazează pe animale (DPRA, KeratinoSens™ și h-CLAT) pentru a detecta prehaptene și prohaptene (9) și pe baza faptului că celulele THP-G8 utilizate în testul IL-8 Luc constituie o linie celulară derivată din THP-1 care este utilizată în testul h-CLAT, testul IL-8 Luc poate contribui, de asemenea, la creșterea sensibilității testelor care nu se bazează pe animale pentru a detecta prehaptene și prohaptene în combinația cu alte teste. Surfactanții testați până la acest moment au generat rezultate pozitive (false) indiferent de tipul lor (de exemplu, cationic, anionic sau on-ionic). În cele din urmă, substanțele chimice care interferează cu luciferaza pot avea efecte asupra activității/măsurării acesteia, cauzând o inhibiție aparentă sau o creștere a luminiscentei (10). De exemplu, concentrațiile de fitoestrogen mai mari de 1 μ M au fost raportate a interfera cu semnalele de luminiscentă ale altor teste asupra genei raportoare bazate pe luciferază din cauza supraactivării genei raportoare pentru luciferază. În consecință, trebuie să se examineze cu atenție expresia luciferazei obținută la concentrații ridicate de fitoestrogeni sau compuși, care este suspectată de a produce o activare similară fitoestrogenilor a genei raportoare pentru luciferază (11). Pe baza considerațiilor de mai sus, surfactanții, anhidridele și substanțele chimice care interferează cu luciferaza sunt în afara domeniului de aplicabilitate al acestui test. În cazul în care există dovezi care demonstrează lipsa de aplicabilitate a testului IL-8 Luc la alte categorii specifice de substanțe chimice de testat, testul nu ar trebui utilizat pentru respectivele categorii specifice.

6. Conform descrierii de mai sus, testul IL-8 Luc susține diferențierea între sensibilizantele și nesensibilizantele pentru piele. Sunt necesare studii suplimentare, de preferat pe baza datelor umane, pentru a stabili dacă rezultatele testului IL-8 Luc pot contribui la evaluarea potenței atunci când sunt analizate împreună cu alte surse de informații.
7. Definițiile sunt prevăzute în apendicele 3.1.

PRINCIPIUL TESTULUI

8. Testul IL-8 Luc utilizează o linie celulară monocitică umană afectată de leucemie THP-1 obținută de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, SUA). Utilizând această linie celulară, Departamentul de Dermatologie din cadrul Universității School of Medicine din Tohoku a stabilit o linie celulară raportoare IL-8 derivată din THP-1, denumită THP-G8, care poartă gene de luciferază Stable Luciferase Orange (SLO) și Stable Luciferase Red (SLR) sub controlul promotorilor IL-8 și, respectiv, ai gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazei (GAPDH) (1). Acest lucru permite măsurarea cantitativă a inducției genei luciferază prin detectarea luminiscentei separat de lumina bine stabilită care produce

substraturi de luciferază ca indicator al activității IL-8 și GAPDH la celule în urma expunerii la substanțe chimice sensibilizante.

9. Sistemul de testare cu două culori cuprinde o luciferază care emite culoarea portocalie (SLO; $\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$) (12) pentru expresia genică a promotorului IL-8 și o luciferază care emite culoarea roșie (SLR; $\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$) (13) pentru expresia genică a promotorului martorului intern, GAPDH. Cele două luciferaze care emit culori diferite la reacția cu firefly d-luciferin și luminiscenta lor se măsoară simultan în cadrul unei reacții într-o singură etapă prin detașarea emisiilor de amestecul de testare cu ajutorul unui filtru optic (14) (apendicele 3.2).
10. Celulele THP-G8 sunt tratate timp de 16 ore cu substanța chimică de testat, după care se măsoară activitatea luciferazei SLO (SLOA-LA), care reflectă activitatea promotorului IL-8 și activitatea luciferazei SLR (SLR-LA), care reflectă activitatea promotorului GAPDH. Pentru a facilita înțelegerea abrevierilor, SLO-LA și SLR-LA sunt desemnate ca fiind IL8LA și, respectiv, GAPLA. Tabelul 1 prezintă o descriere a termenilor asociați activității luciferazei în cadrul testului IL-8 Luc. Valorile măsurate sunt utilizate pentru a calcula valoarea IL8LA normalizată (nIL8LA), care este raportul dintre IL8LA și GAPLA; inducția nIL8LA (Ind-IL8LA), care este raportul dintre mediile aritmetice ale valorilor măsurate de patru ori ale nIL8LA ale celulelor THP-G8 tratate cu o substanță chimică de testat și ale valorilor nIL8LA ale celulelor THP-G8 netratate; și inhibiția GAPLA (Inh-GAPLA), care este raportul dintre mediile aritmetice ale valorilor măsurate de patru ori ale GAPLA ale celulelor THP-G8 tratate cu o substanță chimică de testat și ale valorilor GAPLA ale celulelor THP-G8 netratate, utilizat ca indicator pentru citotoxicitate.

Tabelul 1: Descrierea termenilor asociați activității luciferazei în testul IL-8 Luc

Abrevieri	Definiție
GAPLA	Activitatea luciferazei SLR care reflectă activitatea promotorului GAPDH
IL8LA	Activitatea luciferazei SLO care reflectă activitatea promotorului IL-8
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA a celulelor THP-G8 tratate cu substanțe chimice/nIL8LA a celulelor netratate
Inh-GAPLA	GAPLA a celulelor THP-G8 tratate cu substanțe chimice/GAPLA a celulelor netratate
CV05	Concentrația cea mai scăzută a substanței chimice la care Inh-GAPLA devine $< 0,05$.

11. Există standarde de performanță (PS) (15) pentru a facilita validarea testelor *in vitro* IL-8 ale luciferazei modificate, care sunt similare cu testul IL-8 Luc, și a permite modificarea

promptă a Ghidului 442E al OCDE privind testele pentru includerea acestora. Sistemul de acceptare reciprocă a datelor (MAD) al OCDE va fi garantat doar pentru testele validate în conformitate cu PS, în cazul în care aceste teste au fost revizuite și incluse în Ghidul 442E al OCDE privind testele (16).

DEMONSTRAREA PERFORMANȚEI

12. Înainte de utilizarea de rutină a testului descris în prezentul apendice pentru metoda de testare B.71, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice, utilizând cele 10 substanțe de verificare enumerate în apendicele 3.3, în conformitate cu bunele practici privind metodele *in vitro* (17). În plus, utilizatorii testelor ar trebui să mențină o bază de date istorice generate în urma verificărilor de reactivitate (a se vedea punctul 15) și cu martori pozitivi și tratați cu solvent/vehicul (a se vedea punctele 21-24) și să utilizeze aceste date pentru a confirma faptul că reproductibilitatea testului în laboratorul propriu este asigurată în timp.

PROCEDURA

13. Există procedura standard de operare (PSO) în cazul testului IL-8 Luc, care ar trebui utilizată la efectuarea testului (18). Laboratoarele care doresc să efectueze testul pot obține linia celulară recombinantă THP-G8 de la laboratorul GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonia, la semnarea unui acord de transfer de material (ATM) în conformitate cu condițiile modelului OCDE. În paragrafele următoare sunt descrise componentele și procedurile principale ale testului.

Pregătirea celulelor

14. Linia celulară THP-G8 de la GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonia ar trebui să fie utilizată pentru efectuarea testului IL-8 Luc (a se vedea punctele 8 și 13). La primire, celulele sunt multiplicare (2-4 pasaje) și păstrate înghețate ca stoc omogen. Celulele din acest stoc pot fi multiplicare până la maximum 12 treceri sau maximum 6 săptămâni. Mediul utilizat pentru multiplicare este mediul de cultură RPMI-1640 care conține 10 % ser fetal bovin (FBS), soluție antibiotică/antimicotică (100 U/ml de penicilină G, 100 μg/ml de streptomycină și 0,25 μg/ml de amfotericină B în 0,85 % soluție salină) (de exemplu, GIBCO Cat#15240-062), 0,15 μg/ml Puromycin (de exemplu, CAS:58-58-2) și 300 μg/ml G418 (de exemplu, CAS:108321-42-2).
15. Înainte de a fi utilizate pentru testare, celulele ar trebui să fie calificate prin efectuarea unei verificări de reactivitate. Această verificare ar trebui efectuată la 1-2 săptămâni sau după 2-4 de pasaje de la decongelare, cu ajutorul martorului pozitiv, bromura 4-nitrobenzil (4-NBB), (CAS:100-11-8, cu puritate ≥ 99 %) și al martorului negativ, acidul lactic (AL)

(CAS:50-21-5, cu o puritate $\geq 85\%$). 4-NBB ar trebui să producă un răspuns pozitiv la Ind-IL8LA ($\geq 1,4$), iar AL ar trebui să producă un răspuns negativ la Ind-IL8LA ($< 1,4$). Sunt utilizate pentru test numai celulele pentru care verificarea de reactivitate a fost efectuată cu succes. Verificarea ar trebui să fie efectuată conform procedurilor descrise la punctele 22-24.

16. În scopul testării, celulele THP-G8 sunt însemănțate la o densitate de 5×10^5 celule/ml și cultivate în prealabil în baloane de cultură timp de 48-96 de ore. În ziua testului, celule recoltate din balonul de cultură sunt spălate cu RPMI-1640 conținând 10 % FBS fără antibiotice, și apoi resuspendate în RPMI-1640 conținând 10 % FBS fără antibiotice la 1×10^6 celule/ml. Apoi, celulele sunt distribuite pe o placă de 96 de godeuri cu fund plat de culoare neagră (de exemplu, Costar Cat#3603) de 50 μ l (5×10^4 celule/godeu).

Pregătirea substanței chimice de testat și a substanțelor martor

17. Substanța chimică de testat și substanțele martor se pregătesc în ziua testării. Pentru testul IL-8 Luc, substanțele chimice de testat se dizolvă în X-VIVO™ 15, un mediu fără ser disponibil în comerț (Lonza, 04-418Q), până la concentrația finală de 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 se adaugă la 20 mg de substanță chimică de testat (indiferent de solubilitatea substanței chimice) într-o eprubetă de microcentrifugare și se aduce la un volum de 1 ml, apoi se rotește viguros și se agită pe un rotor la o viteză maximă de 8 rpm timp de 30 de minute la o temperatură ambiantă de aproximativ 20 °C. Apoi, dacă substanțele chimice solide sunt încă solide, eprubeta este supusă procesului sonic până când substanța chimică este dizolvată complet sau dispersată în mod stabil. Pentru substanțele chimice de testat solubile din X-VIVO™ 15, soluția este diluată cu un factor de 5 cu X-VIVO™ 15 și utilizată ca soluție mamă X-VIVO™ 15 a substanței chimice de testat (4 mg/ml). În cazul substanțelor chimice de testat care nu sunt solubile în X-VIVO™ 15, amestecul este rotit din nou timp de cel puțin 30 de minute, apoi centrifugat la 15 000 rpm ($\approx 20\,000g$) timp de 5 minute; supernatantul rezultat este utilizat ca soluție mamă X-VIVO™ 15 a substanței chimice de testat. Utilizarea altor solvenți, cum ar fi DMSO, apă, sau mediu de cultură, ar trebui să fie justificată științific. Procedura detaliată pentru dizolvarea substanțelor chimice este prezentată în apendicele 3.5. Soluțiile X-VIVO™ 15 descrise la punctele 18-23 sunt amestecate 1:1 (v/v) cu suspensiile de celule preparate pe o placă de 96 de godeuri cu fund plat de culoare neagră (a se vedea punctul 16).
18. Primul test are drept scop determinarea concentrației citotoxice și examinarea potențialului de sensibilizare cutanată al substanțelor chimice. Folosind X-VIVO™ 15, diluțiile în serie ale soluțiilor mamă X-VIVO™ 15 ale substanțelor chimice de testat sunt efectuate la factorul doi de diluție (a se vedea apendicele 3.5) folosind un bloc de analiză cu 96 de godeuri (de exemplu: Costar Cat#EW-01729-03). În continuare, se adaugă 50 μ l de soluție diluată în fiecare godeu la 50 μ l de suspensie celulară pe o placă de 96 de godeuri cu fund

plat de culoare neagră. Astfel, pentru substanțele chimice de testat care sunt solubile în X-VIVO™ 15, concentrațiile finale ale substanțelor chimice de testat variază între 0,002 și 2 mg/ml (apendicele 3.5). Pentru substanțele chimice de testat care nu sunt solubile în X-VIVO™ 15 la 20 mg/ml, se determină numai factorii de diluare care se încadrează între 2 și 2^{10} , deși concentrațiile finale reale ale substanțelor chimice de testat rămân incerte și depind de concentrația saturată a substanțelor chimice de testat din soluția mamă X-VIVO™ 15.

19. În cadrul testelor ulterioare (și anume, a doua, a treia și a patra replică), soluția mamă X-VIVO™ 15 este produsă la o concentrație de patru ori mai mare decât concentrația de viabilitate celulară 05 (CV05; cea mai scăzută concentrație la care Inh-GAPLA devine $< 0,05$) în primul experiment. Dacă Inh-GAPLA nu scade sub 0,05 la concentrația cea mai mare în cadrul primului test, soluția mamă X-VIVO™ 15 este preparată la cea mai ridicată concentrație a primului test. Concentrația CV05 se calculează împărțind concentrația soluției mamă din primul test la factorul de diluare pentru CV05 (X) [factorul de diluție CV05 (X); factorul de diluție necesar pentru diluarea soluției mamă la CV05] (a se vedea appendicele 3.5). În cazul substanțelor de testat care nu sunt solubile în X-VIVO la 20 mg/ml, CV05 este determinată prin concentrația soluției mamă $\times 1/X$. Pentru testele 2-4, este preparată a doua soluție mamă ca $4 \times CV50$ (apendicele 3.5).
20. Diluțiile în serie ale soluțiilor mamă de gradul doi X-VIVO™ 15 sunt realizate cu un factor de diluare de 1,5 utilizând un bloc de analiză cu 96 de godeuri. În continuare, se adaugă 50 μ l de soluție diluată în fiecare godeu la 50 μ l de suspensie celulară în godeurile unei plăci de 96 de godeuri cu fund plat de culoare neagră. Fiecare concentrație a fiecărei substanțe chimice de testat ar trebui să fie testată în patru godeuri. Eșantioanele sunt apoi amestecate pe un agitator cu placă și incubate timp de 16 ore la 37 °C și în soluție de 5 % CO₂, după care se măsoară activitatea luciferazei conform descrierii de mai jos.
21. Martorul tratat cu solvent este amestecul de 50 μ l/godeu de X-VIVO™ 15 și de 50 μ l/godeu de suspensie celulară în RPMI-1640 conținând 10 % FBS.
22. Martorul pozitiv recomandat este 4-NBB. Într-o eprubetă de microcentrifugare se prepară 20 mg de 4-NBB, la care se adaugă X-VIVO™ 15 până la 1 ml. Eprubeta se rotește viguros și se agită pe un rotor la o viteză maximă de 8 rpm timp de 30 de minute. După centrifugare la 20 000 g timp de 5 minute, supernatantul este diluat cu un factor de 4 în X-VIVO™ 15 și o cantitate de 500 μ l de supernatant diluat se transferă într-un godeu din blocul de analiză cu 96 de godeuri. Supernatantul diluat este diluat în continuare în X-VIVO™ 15 la factori de 2 și 4 și se adaugă 50 μ l de soluție la 50 μ l de suspensie celulară THP-G8 în godeurile unei plăci cu 96 de godeuri cu fund plat de culoare neagră (apendicele 3.6). Fiecare concentrație a matorului pozitiv ar trebui să fie testată în patru godeuri. Placa se agită pentru un agitator cu placă și se incubează într-un incubator cu CO₂

timp de 16 ore (37 °C, 5 % CO₂), după care se măsoară activitatea luciferazei conform descrierii de la punctul 29.

23. Martorul negativ recomandat este AL. Se prepară 20 mg de AL într-o eprubetă de microcentrifugare de 1,5 ml, la care se adaugă X-VIVO™ 15 până la 1 ml (20 mg/ml). Se diluează 20 mg/ml de soluție AL cu un factor de 5 în X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 µl din această soluție AL de 4 mg/ml AL se transferă într-un godeu dintr-un bloc de analiză cu 96 de godeuri. Această soluție este diluată cu un factor de 2 în X-VIVO™ 15 și apoi diluată din nou cu un factor de 2 pentru a produce soluții de 2 mg/ml și 1 mg/ml. 50 µl din aceste trei soluții și martorul tratat cu vehicul (X-VIVO™ 15) se adaugă la 50 µl de suspensie celulară THP-G8 în godeurile unei plăci de 96 de godeuri cu fund plat de culoare neagră. Fiecare concentrație a martorului negativ este testată în patru godeuri. Placa se agită pentru un agitator cu placă și se incubează într-un incubator cu CO₂ timp de 16 ore (37 °C, 5 % CO₂), după care se măsoară activitatea luciferazei conform descrierii de la punctul 29.
24. Ar putea fi utilizați și alți martori pozitivi sau negativi adecvați în cazul în care sunt disponibile date anterioare pentru a obține criterii comparabile de acceptare a testelor.
25. Ar trebui să se acorde o atenție deosebită pentru a se evita evaporarea substanțelor chimice de testat volatile și contaminarea încrucișată între godeuri a substanțelor chimice de testat, de exemplu, prin acoperirea etanșă a plăcilor înainte de incubarea cu substanțele chimice de testat.
26. Substanțele chimice de testat și martorul tratat cu solvent necesită efectuarea a 2-4 teste pentru obținerea unei estimări pozitive sau negative (a se vedea tabelul 2). Fiecare test independent este efectuat într-o altă zi cu soluții mamă X-VIVO™ 15 proaspete ale substanțelor chimice de testat și celule recoltate în mod independent. Celulele pot proveni din cadrul aceleiași treceri.

Măsurători de activitate ale luciferazei

27. Luminiscenta este măsurată cu ajutorul unui luminometru cu o microplacă de 96 de godeuri dotat cu filtre optice, de exemplu, Phelios (ATTO, Tokyo, Japonia), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Germania) și seria ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Luminometrul trebuie calibrat pentru fiecare test pentru a se asigura reproductibilitatea (19). Pentru această calibrare sunt disponibile luciferaze recombinante de culoarea portocalie și roșie.
28. Se transferă 100 µl de reactiv preîncălzit Tripluc® Luciferase (Tripluc) prevăzut pentru test în fiecare godeu al plăcii care conține suspensia celulară tratată cu sau fără substanță chimică. Placa se agită timp de 10 minute la o temperatură ambiantă de aproximativ 20 °C. Placa se plasează în luminometru pentru măsurarea activității luciferazei. Bioluminiscenta

se măsoară timp de 3 secunde fiecare în absența (F0) și prezența (F1) filtrului optic. Ar trebui să se furnizeze o justificare pentru utilizarea de valori alternative, de exemplu, în funcție de modelul de luminometru utilizat.

29. Parametrii pentru fiecare concentrație sunt calculați de la valorile măsurate, de exemplu, IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, media $\pm$ SD a IL8LA, media $\pm$ SD a GAPLA, media $\pm$ SD a nIL8LA, media $\pm$ SD a Ind-IL8LA, media $\pm$ SD a Inh-GAPLA și intervalul de încredere de 95 % al Ind-IL8LA. Definițiile parametrilor utilizați în prezentul punct sunt prevăzute în apendicele I și, respectiv, IV.
30. Înainte de măsurare, diferențierea culorilor în cadrul testelor de raportare a mai multor culori este realizată, în general, cu ajutorul detectoarelor (luminometrul și cititorul plăcii) prevăzute cu filtre optice, precum filtrele de tip „sharp-cut” (cu trecere lungă sau cu trecere scurtă) sau filtrele „trece banda”. Coeficienții de transmitere ai filtrelor pentru fiecare culoare a semnalului bioluminescenței ar trebui calibrați înainte de testare, conform apendicelui 3.2.

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea datelor

31. Criteriile pentru o decizie pozitivă/negativă impun ca în cadrul fiecărui test:
- o estimare a unui test IL-8 Luc să fie apreciată ca fiind pozitivă dacă o substanță chimică de testat are o valoare Ind-IL8LA $\geq 1,4$ și limita inferioară a intervalului de încredere de 95 % al Ind-IL8LA $\geq 1,0$
 - o estimare a unui test IL-8 Luc să fie apreciată ca fiind negativă dacă o substanță chimică de testat are o valoare Ind-IL8LA $< 1,4$ și limita inferioară a intervalului de încredere de 95 % al Ind-IL8LA $< 1,0$

Model predictiv

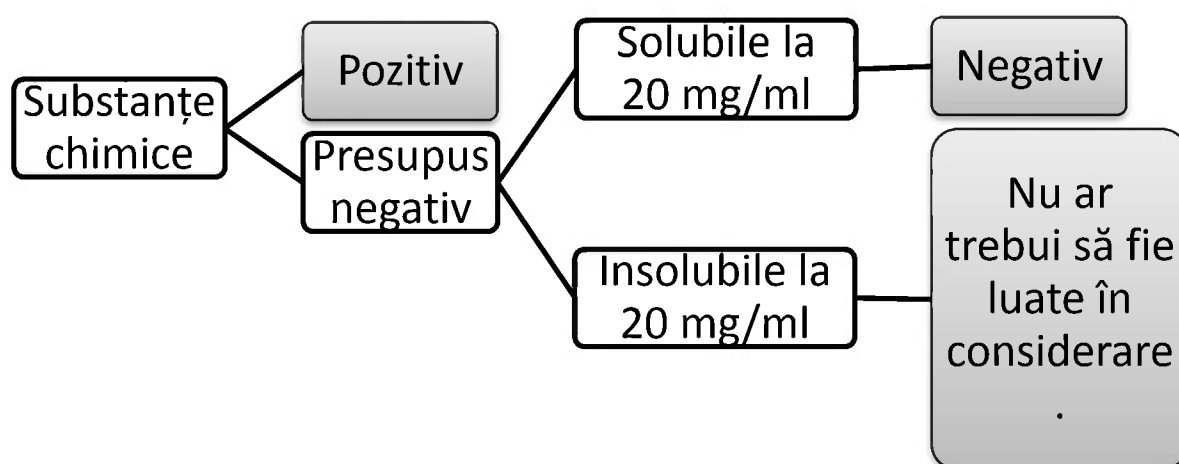
32. Substanțele chimice de testat care generează două rezultate pozitive la testele 1, 2, 3 sau 4 sunt identificate ca fiind pozitive, iar cele care generează trei rezultate negative la testele 1, 2, 3 sau 4 sunt identificate și presupuse ca fiind negative (tabelul 2). Între presupusele substanțe chimice negative, substanțele chimice care sunt dizolvate la cantitatea de 20 mg/ml de X-VOVO™ 15 sunt estimate ca fiind negative, iar substanțele chimice care nu sunt dizolvate la 20 mg/ml de X-VOVO™ 15 nu ar trebui să fie luate în considerare (figura 1).

Tabelul 2: Criterii de identificare a rezultatelor pozitive și a celor presupuse drept negative

testul 1	testul 2	testul 3	testul 4	Estimare finală
----------	----------	----------	----------	-----------------

Pozitiv	Pozitiv	-	-	Pozitiv
	Negativ	Pozitiv	-	Pozitiv
	Negativ	Pozitiv	Pozitiv	
Negativ	Pozitiv	Negativ	Presupus negativ	
		Pozitiv	-	Pozitiv
		Negativ	Pozitiv	Pozitiv
	Negativ	Negativ	Presupus negativ	
		Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv
		Negativ	Presupus negativ	
		Negativ	-	Presupus negativ

Figura 1: Model predictiv pentru estimarea finală



Criterii de acceptare

33. Atunci când se utilizează testul IL-8, ar trebui să fie îndeplinite următoarele criterii de acceptare:

- Ind-IL8LA trebuie să fie peste 5,0 cel puțin într-o concentrație a matorului pozitiv, 4-NBB, în cadrul fiecărui test.
- Ind-IL8LA ar trebui să fie sub 1,4 în orice concentrație a matorului negativ, acidul lactic, în cadrul fiecărui test.
- Datele provenind din plăcile pentru care valoarea GAPLA din godeurile cu mator cu celule și Tripluc, dar fără substanțe chimice, este mai mică decât valoarea echivalentă a de cinci ori valoarea godeului conținând doar mediul de testare (50 μl/godeu de RPMI-1640 conținând 10 % FBS și 50 μl/godeu X-VIVO™ 15) ar trebui să fie respinse.

- Datele provenind din plăcile pentru care valoarea Inh-GAPLA a tuturor concentrațiilor substanțelor chimice de testat sau martor este mai mică de 0,05 ar trebui să fie respinse. În acest caz, primul test ar trebui repetat astfel încât cea mai mare concentrație finală a testului repetat să fie cea mai scăzută concentrație finală a testului anterior.

Raportul testului

34. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanțele chimice de testat

Substanță monocomponentă:

- Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;
- Aspectul fizic, solubilitatea în apă, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există;
- Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;
- Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);
- Solubilitatea în X-VIVO™ 15. În cazul substanțelor chimice insolubile în X-VIVO™ 15, dacă este respectată precipitarea sau flotația după centrifugare;
- Concentrația (concentrațiile) testată(e);
- Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;
- Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat dacă nu a fost utilizat X VIVO™ 15.

Substanța multicomponentă, UVCB și amestec:

- Caracterizarea, dacă este posibil, de exemplu prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), puritatea, apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante (a se vedea mai sus) ale componentelor, dacă există;
- Aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există;
- Masa moleculară sau masa moleculară aparentă în cazul amestecurilor/polimerilor cu compoziții cunoscute sau alte informații relevante pentru efectuarea studiului;
- Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

- Solubilitatea în X-VIVO™ 15. În cazul substanțelor chimice insolubile în X-VIVO™ 15, dacă este respectată precipitarea sau flotația după centrifugare;
- Concentrația (concentrațiile) testată(e);
- Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există.
- Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat dacă nu a fost utilizat X VIVO™ 15.

Martori

Martor pozitiv:

- Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;
- aspectul fizic, solubilitatea în apă, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există și dacă este cazul;
- puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;
- Tratatamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);
- Concentrația (concentrațiile) testată(e);
- Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;
- Trimitere la rezultatele anterioare ale martorilor pozitivi care demonstrează criterii adecvate de acceptare, dacă este cazul.

Martor negativ:

- Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) CAS și/sau alți identificatori;
- puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;
- aspectul fizic, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante în cazul în care sunt utilizați alți martori negativi decât cei menționați în Ghidul pentru teste și dacă aceștia există;
- Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;
- Justificarea alegerii solventului pentru fiecare substanță chimică de testat.

Condiții de testare

- Numele și adresa sponsorului, ale instalației de testare și ale directorului de studiu;
- descrierea testului utilizat;
- linia celulară utilizată, condițiile de depozitare și sursa acesteia (de exemplu, instalația de la a fost obținută aceasta);
- numărul lotului și originea FBC, denumirea furnizorului, numărul lotului de pe placa de 96 de godeuri cu fund plat de culoare neagră și numărul lotului reactivului Tripluc;
- numărul de trecere și densitatea celulară 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;
- luminometrul utilizat (de exemplu, modelul), inclusiv reglajele aparatului, substratul de luciferază utilizat, precum și demonstrarea măsurătorilor corespunzătoare ale luminiscenței pe baza testului de control descris la apendicele 3.2;
- procedura utilizată pentru a demonstra performanțele de laborator la efectuarea testului (de exemplu, prin testarea unor substanțe de verificare) sau pentru a demonstra performanța reproductibilă a testului în timp.

Procedura de testare

- numărul de replici și teste efectuate;
- 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

- măsurătorile IL8LA și GAPLA;
- calculele pentru nIL8LA, Ind-IL8LA și Inh-GAPLA;
- intervalul de încredere de 95 % al Ind-IL8LA;
- un grafic care descrie curbele de răspuns în funcție de doză pentru inducția activității luciferazei și viabilitate;
- O descriere a oricăror alte observații relevante, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor

- Discutarea rezultatelor obținute cu ajutorul testului IL-8 Luc;
- Analiza rezultatelor testului în contextul unei IATA în cazul în care sunt disponibile alte informații relevante.

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K și Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359-69.
- (2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (3) OCDE (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (4) OCDE (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H și Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371-9.
- (6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y și Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816-30.
- (7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337-51.
- (8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N și Itagaki H. (2010). A comparative

evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

- (9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A și Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.
- (10) Thorne N, Inglese J și Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.
- (11) OCDE (2016). Testul nr. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
- (12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M și Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.
- (13) Viviani VR, Bechara EJ și Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixothrix* railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.
- (14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M și Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.
- (15) OCDE (2017). Urmează a se publica - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OCDE, Paris, Franța
- (16) OCDE (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OCDE, Paris, Franța.
- (17) OCDE (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organizația pentru Cooperare

și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa:
http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.

- (18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Publicație disponibilă la adresa:
http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.
- (19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR și Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.
- (20) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OCDE, Paris, Franța.
- (21) Organizația Națiunilor Unite (2015). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS). A șasea ediție revizuită. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Material disponibil la adresa:
http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Apendicele 3.1

DEFINIȚII

Precizie: Gradul de concordanță între rezultatele testului și valorile de referință acceptate. Aceasta măsoară performanța testului și unul dintre aspectele relevanței acestuia. Termenul este adesea utilizat în mod interschimbabil, iar concordanța înseamnă proporția de rezultate corecte ale unui test (16).

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 molecular declanșator până la un răspuns *in vivo* de interes (20).

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

CV05: Viabilitatea celulară 05, și anume concentrația minimă la care substanțele chimice prezintă o valoare Inh-GAPLA mai mică de 0,05.

FInSLO-LA: Abrevierea utilizată în raportul de validare și în publicațiile anterioare privind testul IL-8 Luc referitor la Ind-IL8LA. Pentru definiție, a se vedea Ind-IL8LA.

GAPLA: Activitatea luciferazei Stable Luciferase Red (SLR) ($\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$), reglementată de promotorul GAPDH, care demonstrează viabilitatea celulară și numărul de celule viabile.

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.

II-SLR-LA: Abrevierea utilizată în raportul de validare și în publicațiile anterioare privind testul IL-8 Luc referitor la Inh-GAPLA. Pentru definiție, a se vedea Inh-GAPLA.

IL-8 (Interleukin-8): O citokină derivată din celulele endoteliale, fibroblaste, cheratinocite, macrofage și monocite care cauzează chemotaxia neutrofilelor și a și a limfocitelor T.

IL8LA: Activitate luciferazei Stable Luciferase Orange (SLO) ($\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$), reglementată de promotorul IL-8.

Ind-IL8LA: Inducția în multipli a IL8LA. Se obține prin împărțirea valorii nIL8LA a celulelor THP-G8 tratate cu substanțe chimice la valoarea celulelor THP-G8 nestimulate și reprezintă inducția activității promotorului IL-8 prin intermediul substanțelor chimice.

Inh-GAPLA: Inhibarea GAPLA. Se obține prin împărțirea valorii GAPLA a celulelor THP-G8 tratate cu substanțe chimice la valoarea celulelor THP-G8 netratate și reprezintă citotoxicitatea substanțelor chimice.

Prag minim de inducție (PMI): concentrația cea mai scăzută la care o substanță chimică îndeplinește criteriile pozitive

Amestec: un amestec sau o soluție compus/ă din două sau mai multe substanțe.

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție de cel puțin 80 % (g/g).

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care există mai multe componente principale 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.

nIL8LA: Activitatea luciferazei SLO care reflectă activitatea promotorului IL-8 (IL8LA), normalizată prin activitatea luciferazei SLR care reflectă activitatea promotorului GAPDH (GAPLA) . Aceasta reprezintă o activitate a promotorului IL-8 după analizarea viabilității celulare sau a numărului de celule.

nSLO-LA: Abrevierea utilizată în raportul de validare și în publicațiile anterioare privind testul IL-8 Luc referitor la nIL8LA. Pentru definiție, a se vedea nIL8LA.

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.

Prehaptene: Substanțe chimice care devin sensibilizante prin transformări abiotice.

Prohaptene: Substanțe chimice care necesită activare enzimatică pentru a exercita potențialul de sensibilizare cutanată.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include analiza preciziei (a concordanței) unui test (16).

Fiabilitate: Măsurile ale faptului că un test poate fi efectuat în mod reproductibil, în același

laborator și în laboratoare diferite în timp, atunci când este efectuat utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau între laboratoare și a repetabilității în același laborator (16).

Test: Un test este compus din unul sau mai multe substanțe chimice de testat, care sunt testate concomitent cu un martor solvent/vehicul și un martor pozitiv.

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect în urma testului. Aceasta permite măsurarea preciziei în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (16).

SLO-LA: Abrevierea utilizată în raportul de validare și în publicațiile anterioare privind testul IL-8 Luc referitor la IL8LA. Pentru definiție, a se vedea IL8LA.

SLR-LA: Abrevierea utilizată în raportul de validare și în publicațiile anterioare privind testul IL-8 Luc referitor la GAPLA. Pentru definiție, a se vedea GAPLA.

Martor solvent/vehicul: O probă netratată care conține toate componentele unui sistem de testare, cu excepția celor ale substanței chimice de testat, dar incluzând solventul/vehiculul utilizat. Acesta este utilizat pentru a stabili reacția de bază pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată sau dispersată stabil în același solvent/vehicul. Atunci când este testată concomitent cu un martor de mediu, această probă indică, de asemenea, dacă solventul/vehiculul interacționează cu sistemul testat.

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect în urma testului. Aceasta permite măsurarea preciziei în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (16).

Substanță: Un element chimic și compuși acestuia în stare naturală sau obținut 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.

Surfactant: Numit și agent tensioactiv, aceasta este o substanță, cum ar fi un detergent, care poate să reducă tensiunea la suprafață a unui lichid și, astfel, să îi permită acesteia spumarea sau penetrarea solidelor; este cunoscut, de asemenea, ca agent de umectare. (TG437)

Substanță chimică de testat: orice substanță sau amestec testat(ă) în cadrul acestei metode.

THP-G8: O linie celulară raportoare IL-8 utilizată în cadrul testului IL-8 Luc. Linia celulară THP-1 similară macrofagului uman a fost transfectată în genele pentru luciferază SLO și SLR sub controlul promotorilor IL-8 și, respectiv, GAPDH.

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 se referă la 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 (21).

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

Metodă de testare valabilă: Un test considerat a avea suficientă relevanță și fiabilitate pentru un scop specific și care se bazează pe principii solide din punct de vedere științific. Un test nu este niciodată valabil într-un sens absolut, ci doar în legătură cu un scop definit.

Apendicele 3.2

PRINCIPIUL MĂSURĂRII ACTIVITĂȚII LUCIFERAZEI ȘI AL DETERMINĂRII COEFICIENȚILOR DE TRANSMISIE AI FILTRULUI OPTIC PENTRU SLO ȘI SLR

Se poate utiliza MultiReporter Assay System - Tripluc - cu un luminometru de tip microplacă prevăzut cu un sistem de detectare a mai multor culori, care poate fi montat la un filtru optic [de exemplu, Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)]. Filtrul optic utilizat pentru măsurare este un filtru de 600-620 nm cu trecere lungă sau scurtă, sau un filtru de 600-700 nm de tip band pass.

Măsurarea luciferazelor în două culori cu un filtru optic.

Acesta este un exemplu folosind filtrul Phelios AB-2350 (ATTO). Acest luminometru este prevăzut cu un filtru de 600 nm cu trecere lungă (R60 HOYA Co., de 600 nm LP, filtrul nr. 1) pentru scindarea luminiscentei SLO ($\lambda_{\max} = 580$ nm) și SRL ($\lambda_{\max} = 630$ nm).

Pentru a determina coeficienții de transmitere ai filtrului LP de 600 nm, folosind enzime purificate pentru luciferază SLO și SLR, măsurați mai întâi i) intensitatea intensității bioluminiscentei SLO și SLR fără filtru (F0) și ii) intensitatea bioluminiscentei SLO și SLR care a trecut prin filtrul LP de 600 nm (filtrul 1) și iii) calculați coeficienții de transmitere ai filtrului LP de 600 nm pentru SLO și SLR care sunt menționați în continuare.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	κO_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLR

Atunci când intensitatea SLO și SLR în eșantion este definită ca O și, respectiv, R, i) intensitatea luminii fără filtru (complet optic) F0 și ii) intensitatea luminii care transmite prin filtrul LP de 600 nm (filtrul 1) F1 sunt descrise mai jos.

$$F0=O+R$$

$$F1=\kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$$

Aceste formule ar putea fi reformulate, după cum urmează:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Apoi, folosind factorii de transmitanță calculați (κO_{R60} și κR_{R60}) și având valorile F0 și F1 măsurate, puteți calcula valoarea O și R, după cum urmează:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Materiale și metode pentru determinarea factorului de transmitanță

(1) Reactivi

Enzime simple purificate luciferaze:

Enzima SLO purificată liofilizată

Enzima SLR purificată liofilizată

(care, pentru activitatea de validare, au fost obținute de la laboratorul LMP Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonia cu linia celulară THP-G8)

Reactiv pentru testare:

Reactivul pentru testare Tripluc® Luciferase (spre exemplu, de la TOYOBO Cat#MRA-301)

Mediu: pentru testul luciferazei (30 ml, stocat la 2-8 °C)

Concentr.	reactivului	Concentrație finală în mediu	Cantitate necesară
RPMI-1640	-	-	27 ml
FBS	-	10 %	3 ml

(2) Prepararea soluției enzimatică

Se dizolvă o enzimă luciferază purificată liofilizată în eprubetă, adăugând 200 μ l de 10 ~ 100 mM Tris/HCl sau Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0), se completează cu glicerol în proporție de 10 % (g/v), se împarte soluția enzimei în alicote de 10 μ l în eprubete de unică folosință de 1,5 ml și se depozitează într-un congelator la -80 °C. Soluția enzimatică înghețată poate fi utilizată timp de maxim șase luni. La utilizare, se adaugă 1 ml de mediu pentru testul luciferazei (RPMI-1640 cu 10 % FBS) în fiecare eprubetă care conține soluțiile enzimatică (soluție enzimatică diluată) și se păstrează pe gheață pentru a preveni dezactivarea.

(3) Măsurarea bioluminescenței

Reactivul pentru testare Tripluc® Luciferase (Tripluc) se decongelează și se păstrează la temperatura camerei, fie într-o baie de apă, fie la temperatura ambiantă. Se activează

luminometrul cu 30 de minute înainte de începerea măsurătorii pentru a permite stabilizarea fotomultiplicatorului. Se transferă 100 µl de soluție enzimatică diluată pe o placă cu 96 de godeuri de culoare neagră (cu fund plat) (eșantion de referință SLO pentru #B1, #B2 și #B3 și eșantionul de referință SLR pentru #D1, #D2, #D3). Se transferă apoi 100 µl de Tripluc preîncălzit în fiecare godeu al plăcii care conține soluția enzimatică diluată, folosind o pipetă. Se agită placa timp de 10 minute la temperatura camerei (aproximativ 25 °C) folosind un agitator pentru placă. Dacă apar bule în soluțiile din godeuri acestea sunt eliminate. Se așază placa în luminometru pentru a măsura activitatea luciferazei. Bioluminescența se măsoară timp de 3 secunde fiecare în absența (F0) și prezența (F1) filtrului optic.

Coeficientul de transmisie al filtrului optic a fost calculat după cum urmează:

Coeficientul de transmisie [SLO (κ_{OR60})] = (#B1 al F1+ #B2 al F1+ #B3 al F1) / (#B1 al F0+ #B2 al F0+ #B3 al F0)

Coeficientul de transmisie [SLR (κ_{R60})] = (#D1 al F1+ #D2 al F1+ #D3 al F1) / (#D1 al F0+ #D2 al F0+ #D3 al F0)

Factorii de transmitanță calculați se utilizează pentru toate măsurătorile efectuate folosind același luminometru.

Controlul calității echipamentului

Ar trebui să fie utilizate procedurile descrise în protocolul IL-8 Luc (18).

Apendicele 3.3

SUBSTANȚE DE VERIFICARE

Înainte de utilizarea de rutină a testului descris în prezentul apendice la metoda de testare B.71, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice prin obținerea estimării în urma testului IL-8 Luc pentru cele zece substanțe de verificare recomandate în tabelul 1 și prin obținerea de valori care să se încadreze în plaja de valori de referință corespunzătoare pentru cel puțin opt dintre cele zece substanțe de verificare (selecțate pentru a reprezenta intervalul de răspunsuri pentru pericolele de sensibilizare cutanată). Alte criterii de selecție au fost ca substanțele să fie disponibile în comerț și să fie disponibile date de referință *in vivo* de înaltă calitate, precum și date *in vitro* de înaltă calitate generate cu testul IL-8 Luc. De asemenea, sunt disponibile date de referință publicate pentru testul IL-8 Luc (6) (1).

Tabelul 1: Substanțe recomandate pentru demonstrarea performanțelor tehnice cu testul IL-8 Luc

Substanțe de verificare	Nr. CAS	Stare	Solubilitate în X-VIVO15 la 20 mg/ml	Estimarea <i>in vivo</i> ¹	Estimarea IL-8 Luc ²	Interval de referință (μg/ml) ³	
						CV05 ⁴	IL-8 Luc MIT ⁵
2,4-dinitroclorbenzen	97-00-7	Solid	Insolubil	Sensibilizant (Extrem)	Pozitiv	2,3-3,9	0,5-2,3
Formaldehidă	50-00-0	Lichid	Solubil	Sensibilizant (Puternic)	Pozitiv	9-30	4-9
2-mercaptobenzotiazol	149-30-4	Solid	Insolubil	Sensibilizant (Moderat)	Pozitiv	250-290	60-250
Etilendiamină	107-15-3	Lichid	Solubil	Sensibilizant (Moderat)	Pozitiv	500-700	0,1-0,4
Etilen glicol dimetacrilat	97-90-5	Lichid	Insolubil	Sensibilizant (Slab)	Pozitiv	>2000	0,04-0,1
4-alilanol (Estragol)	140-67-0	Lichid	Insolubil	Sensibilizant (Slab)	Pozitiv	>2000	0,01-0,07
Streptomicină sulfat	3810-74-0	Solid	Solubil	Non- sensibilizant	Negativ	>2000	>2000
Glicerină	56-81-5	Lichid	Solubil	Non- sensibilizant	Negativ	>2000	>2000
Izopropanol	67-63-0	Lichid	Solubil	Non- sensibilizant	Negativ	>2000	>2000

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

¹ Potența *in vivo* este derivată pe baza criteriilor propuse de ECETOC (19).

² Pe baza valorilor anterioare observate (1) (6).

³ Valorile CV05 și IL-8 Luc MIT au fost calculate folosind solubilitatea în apă dată de EPI Suite™.

⁴ CV05: concentrația minimă la care substanțele chimice prezintă o valoare Inh-GAPLA mai mică de 0,05.

⁵ MIT: concentrațiile cele mai scăzute la care o substanță chimică îndeplinește criteriile pozitive.

Apendicele 3.4

INDICI ȘI CRITERII DE APRECIERE

nIL8LA (nSLO-LA)

Repetarea j-th ($j = 1-4$) a concentrației i-th ($i = 0-11$) se măsoară pentru IL8LA (SLO-LA) și, respectiv, GAPLA (SLR-LA). Valoarea IL8LA normalizată, denumită nIL8LA (nSLO-LA) și definită ca:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij} / GAPLA_{ij}$$

Aceasta este unitatea de măsură de bază în cadrul acestui test.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Creșterea în multipli a mediei nIL8LA (nSLO-LA) pentru repetiția la concentrația i-th, în comparație cu aceasta la concentrația 0, Ind-IL8LA, reprezintă principala măsură a acestui test. Acest coeficient este scris prin următoarea formulă:

$$\text{Ind} - \text{IL8LA}_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j} \right\}$$

Laboratorul principal a propus ca o valoare de 1,4 să corespundă unui rezultat pozitiv pentru substanța chimică testată. Această valoare este bazată pe examinarea datelor istorice ale laboratorului principal. Echipa de gestionare a datelor a utilizat apoi această valoare în toate etapele studiului de validare. Rezultatul principal, Ind-IL8LA, constituie raportul dintre două medii aritmetice, astfel cum se arată în ecuație.

Interval de încredere de 95 % (CI 95 %)

Intervalul de încredere de 95 % (CI 95 %), care este bazat pe coeficient, poate fi estimat pentru a indica precizia măsurării acestui rezultat principal. Limita inferioară a CI de 95 % ≥ 1 indică faptul că valoarea nIL8LA cu o concentrație i-th este semnificativ mai mare decât cea cu martor tratat cu solvent. Există mai multe modalități de a construi CI de 95 %. În acest studiu am utilizat metoda cunoscută drept teorema lui Fieller. Această teoremă privind intervalul de încredere de 95 % este obținută din următoarea formulă:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \right],$$

Unde

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}, \quad B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}, \quad C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4,$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}, \quad sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2,$$

$$n_{yi} = 4, \quad \bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij}), \quad sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yi} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2.$$

$t_{0,975(v)}$ este 97,5 percentile din distribuția t centrală cu v grade de libertate, unde

$$v = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Valoarea Inh-GAPLA reprezintă un coeficient al mediei GAPLA (SLR-LA) pentru repetarea concentrației i-th în comparație cu cea cu martor tratat cu solvent, iar aceasta este scrisă prin

$$Inh - GAPLA_i = \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j}\}.$$

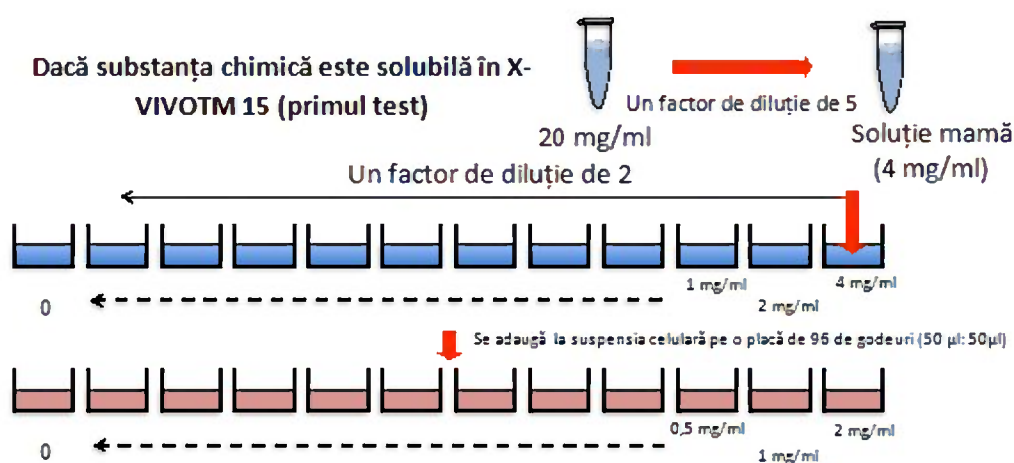
Întrucât valoarea GAPLA este numitorul nIL8LA, o valoare extrem de mică determină o variație mare a valorii nIL8LA. Prin urmare, valorile Ind-IL8LA având o valoare extrem de mică a Inh-GAPLA (sub 0,05) ar putea fi considerate a reprezenta un nivel scăzut de precizie.

Apendicele 3.5

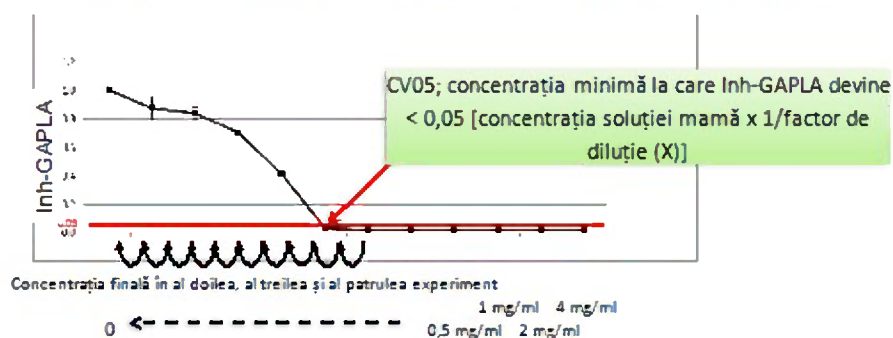
SCHEMA METODELOR DE DIZOLVARE A SUBSTANȚELOR CHIMICE PENTRU TESTUL IL-8 LUC.

(a) Pentru substanțele chimice dizolvate în X-VIVO™ 15 la 20 mg/ml

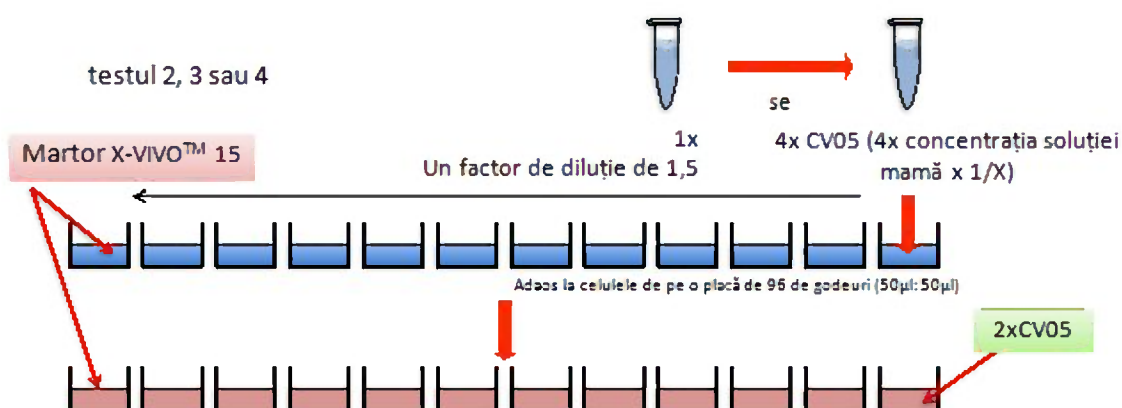
Dacă substanța chimică este solubilă în X-VIVOTM 15 (primul test)



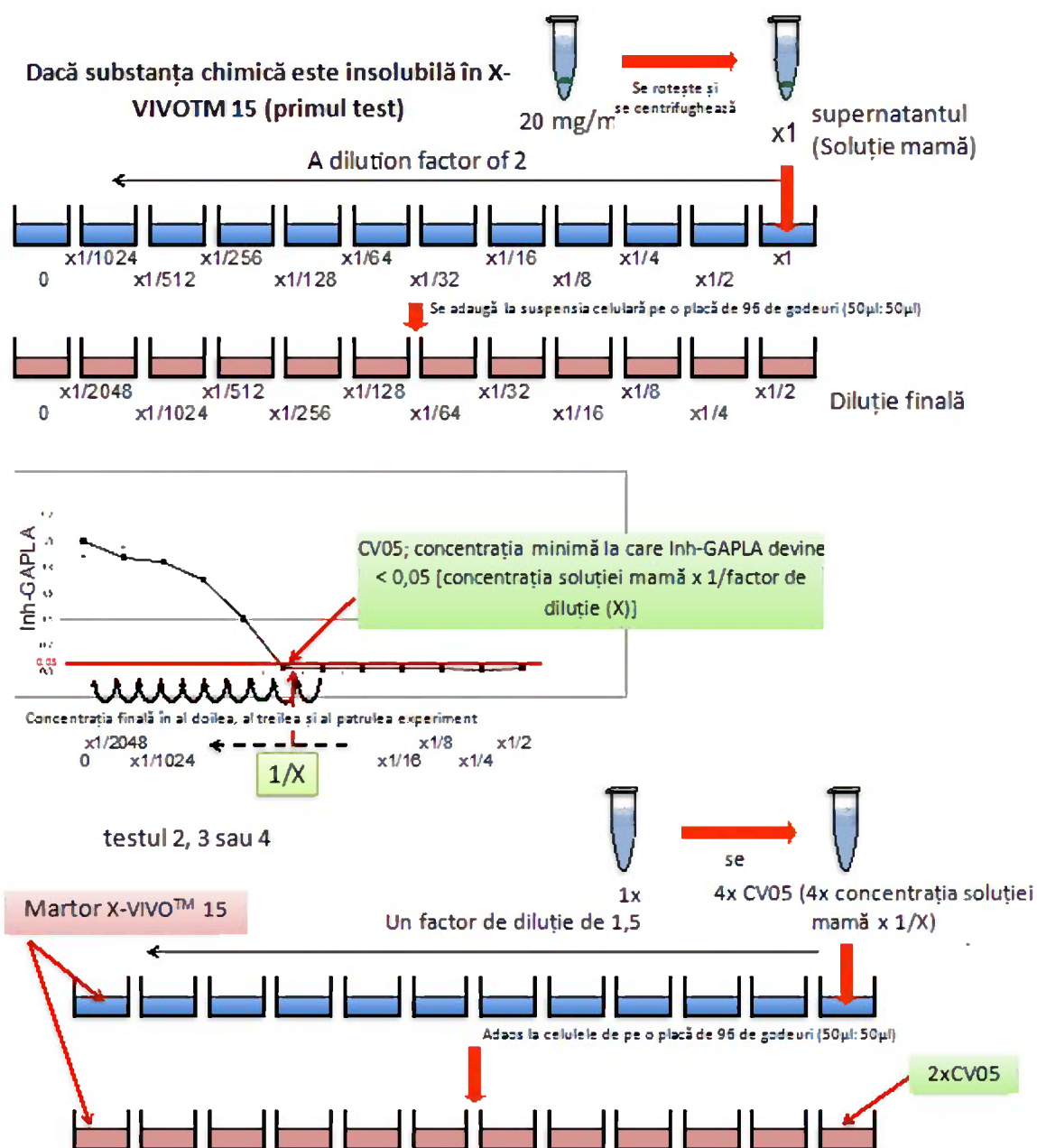
Se stabilește cea mai mare concentrație a următoarelor experimente



testul 2, 3 sau 4

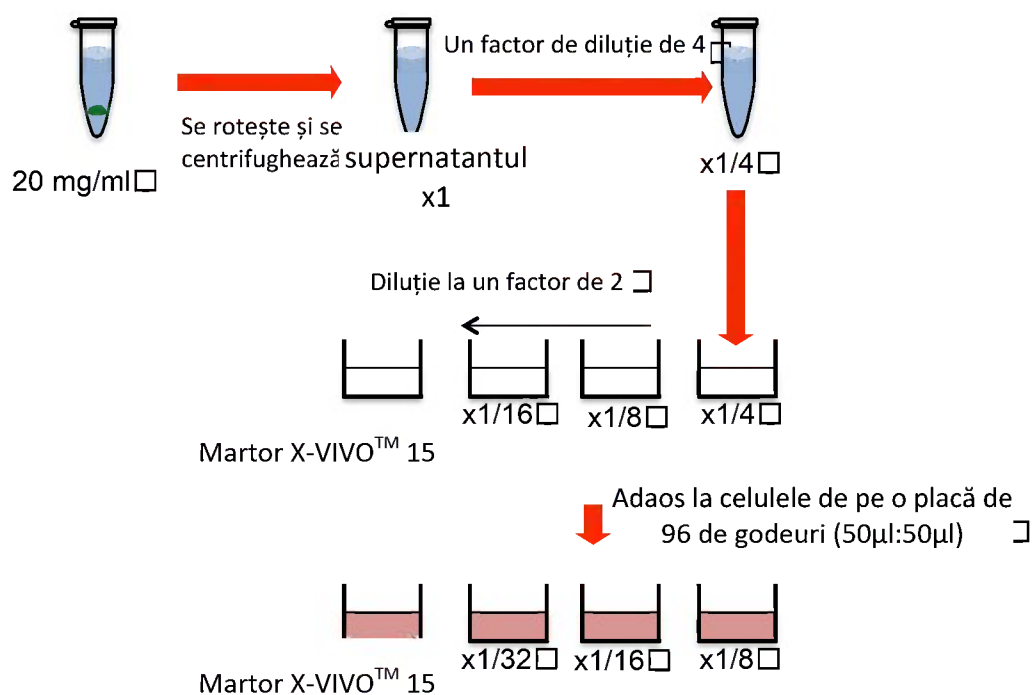


(b) Pentru substanțele chimice insolubile în X-VIVOTM 15 la 20 mg/ml



Apendicele 3.6**SCHEMA METODEI DE DIZOLVARE A 4-NBB PENTRU MARTORUL POZITIV AL TESTULUI IL-8 LUC.**

Martorul pozitiv: 4-NBB (însolubil în X-VIVO™ 15) □



”

(9) În partea C, se adaugă următoarele capitole:

„C.52 STUDIU EXTINS ASUPRA REPRODUCERII PE DURATA UNEI GENERAȚII PENTRU SPECIA MEDAKA (MEDAKA EXTENDED ONE GENERATION REPRODUCTION TEST -MEOGRT)

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 240 (2015). Studiul extins asupra reproducerii pe durata unei generații pentru specia medaka (MEOGRT) descrie o metodă de testare cuprinzătoare bazată pe expunerea de pești, de-a lungul mai multor generații, pentru a furniza date relevante pentru evaluarea riscurilor ecologice și a riscurilor legate de substanțele chimice, inclusiv substanțe chimice suspectate de a provoca tulburări ale sistemului endocrin (EDC). Expunerea în testul MEOGRT continuă până la ecloziune (timp de două săptămâni după fertilizare, sdf) în cea de a doua generație (F2). Ar fi necesare investigații suplimentare pentru a justifica utilitatea extinderii generației F2 dincolo de momentul ecloziunii; în acest moment, nu există suficiente informații pentru a asigura condițiile sau criteriile relevante care să garanteze extinderea generației F2. Însă această metodă de testare poate fi actualizată pe măsură ce sunt luate în considerare informații și date noi. De exemplu, orientările privind extinderea generației F2 prin reproducere pot fi utile în anumite circumstanțe (de exemplu substanțele chimice cu potențial ridicat de bioconcentrare sau cu indicații privind efecte transgeneraționale la alți taxoni). Această metodă de testare poate fi utilizată pentru a evalua efectele cronice potențiale ale substanțelor chimice, inclusiv ale substanțelor chimice care pot provoca tulburări ale sistemului endocrin, asupra peștilor. Metoda pune accent, în principal, pe efectele potențiale relevante asupra populației (și anume, efecte adverse asupra supraviețuirii, dezvoltării, creșterii și reproducerii) pentru calcularea unei concentrații fără efect observat (CFEO) sau a unei concentrații efective (CEEx), deși ar trebui remarcat faptul că abordările CEEx sunt rareori adecvate pentru studii ample de acest tip, unde este posibil să nu fie practică o creștere a numărului de concentrații de testare pentru a permite determinarea CEEx dorite, ceea ce poate cauza, de asemenea, probleme semnificative de bunăstare a animalelor din cauza numărului mare de animale utilizate. Pentru substanțele chimice care nu necesită o evaluare de-a lungul „mai multor generații” sau substanțele chimice care nu sunt substanțe chimice care pot provoca tulburări ale sistemului endocrin, ar putea fi mai adecvate alte metode de testare (1). Specia japoneză medaka este specia potrivită pentru a fi utilizată în cadrul acestei metode de testare, având în vedere ciclul de viață scurt al acesteia și posibilitatea de a-i determina sexul genetic (2), aceasta fiind considerată a fi o componentă esențială în cadrul acestei metode de testare. Metodele specifice și punctele finale de observație detaliate în prezenta metodă sunt

aplicabile numai pentru specia japoneză medaka. Alte specii de pești mici (de exemplu, peștele-zebră) pot fi adaptate la un protocol de testare similar.

2. Această metodă de testare măsoară mai multe puncte finale biologice. Se acordă o importanță deosebită efectelor negative potențiale asupra parametrilor relevanți pentru populație, inclusiv supraviețuirea, dezvoltarea brută, creșterea și reproducerea. În al doilea rând, pentru a furniza informații mecaniciste și pentru a asigura o legătură între rezultatele altor tipuri de studii în teren și în laborator, în cazul în care există dovezi *a posteriori* pentru o substanță chimică care declanșează o activitate potențial provocatoare de tulburări ale sistemului endocrin (*de exemplu*, o activitate androgenică sau estrogenică în cadrul altor teste și analize), se obțin alte informații utile prin măsurarea valorii mRNA a *vitelogeninei* (*vgt*) (sau a proteinei vitelogenina, VTG), a caracteristicilor sexuale secundare fenotipice (SSC) aferente sexului genetic, precum și evaluarea histopatologiei. Ar trebui remarcat faptul că, în cazul în care o substanță chimică de testat sau metaboliții săi nu sunt suspectați de a fi EDC, este posibil să nu fie necesară măsurarea acestor puncte finale secundare și ar putea fi adecvate mai puține studii cu utilizare intensivă a resurselor și animalelor (1). Definițiile utilizate în cadrul acestei metode de testare sunt prezentate în apendicele 1.

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

3. Din cauza numărului limitat de substanțe chimice testate și al laboratoarelor implicate în procesul de validare a acestui test destul de complex, se prevede că, atunci când un număr suficient de studii sunt disponibile pentru a confirma impactul acestui nou model de studiu, metoda de testare va fi analizată și, dacă este necesar, va fi revizuită în contextul experienței dobândite. Datele pot fi utilizate la nivelul 5 din Cadrul conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini (3). Metoda de testare începe prin expunerea peștilor adulți (generația F0) la substanța chimică de testat în faza de reproducere. Expunerea continuă în etapa de dezvoltare și reproducere la generația F1 și de eclozare la generația F2; astfel, testul permite evaluarea atât a parcursului endocrin structural, cât și a celui activational. O abordare bazată pe forța probantă a datelor poate fi aplicată atunci când se interpretează punctele finale aferente sistemului endocrin.
4. Testul ar trebui să includă un număr adecvat de persoane pentru a asigura o putere suficientă de evaluare a punctelor finale relevante ale reproducerii (a se vedea apendicele 3), asigurându-se în același timp faptul că numărul de animale utilizate constituie minimul necesar din motive de bunăstare a animalelor. Având în vedere numărul mare de animale utilizate pentru testare, este important să se analizeze cu atenție necesitatea efectuării testului în raport cu datele existente care ar putea conține deja

informații relevante privind multe dintre punctele finale din MEOGRT. În acest sens, se poate obține asistență în contextul Cadrului OCDE privind testele de toxicitate la pești (1).

5. Metoda de testare a fost concepută în principal pentru a distinge efectele unei singure substanțe. Însă, dacă se impune efectuarea unui test asupra unui amestec, ar trebui luat în considerare dacă acesta va oferi rezultate acceptabile pentru scopul de reglementare prevăzut.
6. Înainte de începerea testului, este important să existe informații cu privire la proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice de testat, în special pentru a permite adoptarea de soluții chimice stabile. De asemenea, este necesar să existe o metodă analitică suficient de sensibilă pentru verificarea concentrațiilor substanțelor chimice de testat.

PRINCIPIUL TESTULUI

7. Testul începe prin expunerea masculilor și femelelor mature din punct de vedere sexual (cel puțin 12 sdf) în perechi de reproducere, timp de 3 săptămâni, iar în această perioadă substanța chimică de testat este distribuită în organismul generației parentale (F0) conform comportamentului său toxicocinetic. Cât mai aproape posibil de prima zi a celei de a patra săptămâni, se colectează ouă pentru a începe generația F1. În perioada de creștere a generației F1 (în total 15 săptămâni), se analizează capacitatea de eclozare și supraviețuirea. În plus, peștii sunt incluși în eșantion la 9-10 sdf pentru punctele finale de dezvoltare și se analizează perioada de depunere a icrelor timp de trei săptămâni, de la 12 la 14 sdf. O generație F2 începe după a treia săptămână de la evaluarea reproducerii, aceasta fiind crescută până la încheierea procesului de ecloziune.

CRITERIILE DE VALIDITATE A TESTULUI

8. Se aplică următoarele criterii de valabilitate a testului:
 - concentrația oxigenului dizolvat ar trebui să fie, pe parcursul testării, $\geq 60\%$ din valoarea saturației aerului;
 - Temperatura medie a apei pe întreaga durată a studiului ar trebui să fie cuprinsă între $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ și $26\text{ }^{\circ}\text{C}$. Abaterile scurte de la medie în acvarii individuale nu ar trebui să fie mai mari de $2\text{ }^{\circ}\text{C}$;
 - Fecunditatea medie a martorilor în fiecare dintre generații (F0 și F1) ar trebui să fie mai mare de 20 de ouă per pereche pe zi. Fertilitatea tuturor ouălor produse în timpul analizei ar trebui să fie mai mare de 80% . În plus, 16 dintre cele 24 de perechi de reproducere martor recomandate ($> 65\%$) ar trebui să producă mai mult de 20 de ouă pe pereche pe zi;

- capacitatea de eclozare la martori ar trebui să fie ≥ 80 % (medie) (pentru fiecare dintre generațiile F1 și F2);
- rata de supraviețuire după eclozare, până la 3 sdf și după 3 sdf, până în etapa finală pentru generația F1 (și anume, 15 sdf) ar trebui să fie ≥ 80 % (medie) și, respectiv, ≥ 90 % (medie), la martori (F1);
- trebuie să existe dovezi care să demonstreze menținerea satisfăcătoare a concentrațiilor substanței utilizate în test în intervalul de ± 20 % din valorile medii măsurate.

În ceea ce privește temperatura apei, deși nu este un criteriu de validitate, duplicatele în cadrul unui tratament nu ar trebui să fie diferite unele față de altele din punct de vedere statistic, iar grupurile de tratament din cadrul testului nu ar trebui să fie diferite unele față de altele din punct de vedere statistic (pe baza măsurătorilor de temperatură zilnice și excluzând abaterile de scurtă durată).

9. Deși se poate observa o scădere a reproducerii la grupurile cu expunere mai mare, ar trebui să existe reproducere suficientă în cel puțin al treilea cel mai mare grup și în toate grupurile mai mici de F0 pentru a umple incubatoarele de eclozare. În plus, ar trebui să existe o rată adecvată de supraviețuire a embrionilor în al treilea cel mai mare grup de expunere și în grupurile mai mici de expunere din F1 pentru a permite evaluarea punctelor finale la eșantionarea subadultilor (a se vedea punctele 36 și 38 și appendicele 9). În plus, ar trebui să existe cel puțin un nivel minim de supraviețuire după eclozare (~ 20 %) în cel de al doilea cel mai mare grup de expunere din F1. Acestea nu sunt criterii de validitate, ca atare, ci recomandări pentru a permite calcularea valorilor CFEO sigure.
10. Dacă se observă o abatere de la criteriile de validitate a testului, consecințele ar trebui să fie luate în considerare în raport cu fiabilitatea rezultatelor testului, iar aceste abateri și considerații ar trebui să fie incluse în raportul testului.

DESCRIEREA METODEI

Aparatură

11. 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) rezervoare din material chimic inert și de capacitate adaptată la valorile recomandate de încărcare și densitate a populației (a se vedea appendicele 3);
- (e) balanță cu precizie adecvată (mai exact, precizie de $\pm 0,5$ mg).

Apă

12. Orice tip de apă în care specia de testat supraviețuiește și crește o perioadă îndelungată în mod corespunzător poate fi utilizată ca apă în scopul testării. Apa ar trebui să prezinte o calitate constantă pe durata testului. Pentru a obține certitudinea că apa de diluție nu influențează în mod necorespunzător rezultatele testelor (de exemplu, prin complexare cu substanța chimică de testat) sau nu afectează negativ comportamentul peștilor reproducători, ar trebui prelevate periodic probe pentru analiză. În cazul în care se cunoaște calitatea relativ constantă a apei de diluție, ar trebui să se măsoare, de exemplu la șase luni, 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-}), pesticide, carbon organic total și materii solide în suspensie. Unele caracteristici chimice ale unei ape de diluție acceptabile sunt prezentate în apendicele 2. pH-ul apei ar trebui să fie cuprins în intervalul 6,5-8,5, dar pe durata unui anumit test, acesta ar trebui să se încadreze într-un interval de $\pm 0,5$ unități.

Sistemul de expunere

13. Nu se specifică modelul și materialele utilizate pentru sistemul de expunere. Pentru construirea sistemului de testare ar trebui să se utilizeze sticlă, oțel inoxidabil sau alt material inert din punct de vedere chimic care nu a fost contaminat în cadrul testelor anterioare. În scopurile acestui test, un sistem de expunere adecvat poate fi compus dintr-un sistem cu flux continuu (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13).

Soluții de testat

14. Soluția mamă a substanței chimice de testat ar trebui să fie introdusă în sistemul de expunere printr-o pompă corespunzătoare. Debitul soluției mamă ar trebui să fie calibrat în conformitate cu confirmarea analitică a soluțiilor de testat înainte de începerea expunerii și verificat din punct de vedere volumetric în mod regulat, pe durata testului. Soluția de testat din fiecare cameră este reînnoită în mod corespunzător (de exemplu, minimum cinci reînnoiri de volum/zi până la 16 reînnoiri/zi sau un debit de maxim 20 ml/min flux), în funcție de stabilitatea substanței chimice de testat și de calitatea apei.
15. Soluțiile de testat din concentrațiile alese se prepară prin diluarea unei soluții mamă. Soluțiile mamă ar trebui să se prepare, de preferință, pur și simplu prin amestecarea sau agitarea substanței chimice de testat în apa de diluție prin mijloace mecanice (de exemplu, agitare și/sau ultrasonificare). Pentru obținerea unei soluții mamă cu o concentrație corespunzătoare se pot folosi coloane/sisteme de saturare sau metode de dozare pasivă (14). Ar trebui să se depună toate eforturile pentru evitarea solvenților sau a purtătorilor deoarece: (1) anumiți solvenți pot avea ca rezultat toxicitatea și/sau răspunsuri nedorite sau neașteptate, (2) testarea substanțelor chimice peste solubilitatea lor în apă (astfel cum se poate întâmpla frecvent prin utilizarea solvenților) poate duce la determinări

inexacte ale concentrațiilor efective, (3) utilizarea solvenților în teste pe termen mai lung poate conduce la un grad semnificativ de „biofilmare” asociat cu activitatea microbiană, ceea ce ar putea avea un impact asupra condițiilor de mediu și a capacității de a menține concentrațiile de expunere și (4) în absența unor date istorice care să demonstreze că solventul nu influențează rezultatul studiului, utilizarea solvenților necesită un tratament al matorului tratat cu solvent care are implicații asupra bunăstării animalelor, întrucât sunt necesare animale suplimentare pentru efectuarea testului. În cazul substanțelor chimice care sunt dificil de testat, ar putea fi utilizat un solvent, în ultimă instanță, și ar trebui consultat documentul de orientare nr. 23 al OCDE privind testarea toxicității acvatică a substanțelor și amestecurilor dificile (15) pentru a determina cea mai bună metodă. Alegerea solventului va fi determinată de proprietățile chimice ale substanței chimice de testat și de disponibilitatea datelor istorice privind utilizarea solventului. În cazul în care se utilizează solvenți purtători, ar trebui să se evalueze matori solvenți adecvați, în plus față de matorii non-solvenți (negativi) (doar apa de diluție). În cazul în care utilizarea unui solvent este inevitabilă și se produce activitatea microbiană (bio-filmare), se recomandă înregistrarea/raportarea bio-filmării pe rezervor (cel puțin săptămânal) pe durata testului. În mod ideal, concentrația solventului ar trebui să fie menținută constantă în matorul solvent și în toate tratamentele pentru testare. În cazul în care concentrația solventului nu este menținută constantă, în matorul solvent ar trebui utilizată cea mai mare concentrație în cadrul tratamentului pentru testare. În cazurile în care se utilizează solvent purtător, concentrațiile maxime ale solvenților nu ar trebui să depășească 100 µl/l sau 100 mg/l (15) și se recomandă să se mențină concentrația solventului la un nivel cât mai scăzut posibil (*de exemplu*, < 20 µl/l) pentru a se evita efectul potențial al solventului asupra punctelor finale măsurate (16).

Animalele de testare

Selectarea și păstrarea peștelui

16. Specia testată este medaka japoneză *Oryzias latipes*, datorită ciclului său de viață scurt și posibilității de determinare a sexului genetic. Deși alte specii de pești mici pot fi adaptate la un protocol de testare similar, metodele specifice și punctele finale de observație detaliate în prezenta metodă de testare sunt aplicabile numai pentru medaka japoneză (a se vedea punctul 1). Medaka este indusă cu ușurință pentru a se înmulți în captivitate; există metode publicate pentru cultura sa (17) (18) (19), precum și date din cadrul testelor referitoare la mortalitatea pe termen scurt, la primele stadii de viață și întregul ciclu de viață (5) (6) (8) (9) (20). Toți peștii sunt expuși la lumină timp de 16 ore și 8 ore la întuneric. Peștii vor fi hrăniți cu creveți în saramură vii, specia *Artemia* spp., larve nauplius care pot fi suplimentate cu hrană sub formă de fulgi din comerț, dacă este necesar. Hrana sub formă de fulgi din comerț ar trebui analizată în mod regulat pentru identificarea contaminanților.

17. Atâta timp cât se respectă practici de creștere adecvate, nu este necesar niciun protocol specific de cultură. De exemplu, peștii medaka pot fi crescuți în bazine de 2 l cu 240 pești larvari pentru fiecare bazin până la 4 sdf, apoi aceștia pot fi crescuți în bazine de 2 l cu 10 pești per bazin până la 8 sdf, după care sunt transferați în perechi de reproducție în bazine de 2 l.

Aclimatarea și selecția peștilor

18. Peștii pentru testare ar trebui să fie selectați dintr-un singur stoc de laborator care a fost aclimatat timp de cel puțin două săptămâni înainte de test în condiții de calitate a apei și de iluminare similare celor utilizate în cadrul testului (Notă: Această perioadă de aclimatare nu este o perioadă de expunere prealabilă *in situ*). Se recomandă să se obțină pești pentru testare dintr-o cultură internă, deoarece transportul peștilor adulți este stresant și poate afecta reproducerea fiabilă. Peștii ar trebui hrăniți cu creveți în saramură vii, larve nauplius, de două ori pe zi în perioada de deținere și în faza de expunere, hrana fiind suplimentată de un tip de hrană sub formă de fulgi disponibilă în comerț, dacă este necesar. Pentru a iniția acest test și a asigura o replicare adecvată, se consideră că sunt necesare minim 42 de perechi de reproducție (54 de perechi de reproducție în cazul în care este necesar un martor solvent din cauza lipsei unor date istorice care să susțină utilizarea exclusivă a martorului solvent). În plus, fiecare pereche de reproducție din generația F0 ar trebui să fie verificată pentru a fi XX-XY (și anume, o relație complementară normală de cromozomi sexuali la fiecare sex) pentru a evita o posibilă includere a masculilor spontani XX (a se vedea punctul 39).
19. În faza de aclimatare, ar trebui să se înregistreze mortalitatea la peștii de cultură și să se aplice următoarele criterii după o perioadă de instalare de 48 de ore:
- Mortalitatea mai mare de 10 % la populația de cultură în perioada de șapte zile dinaintea transferului în sistemul de testare: se respinge întregul lot;
 - Mortalitatea între 5 % și 10 % la populația de cultură în perioada de șapte zile dinaintea transferului în sistemul de testare: se asigură aclimatarea pentru șapte zile în plus față de perioada de aclimatare de două săptămâni; dacă mortalitatea este peste 5% în a doua perioadă de șapte zile, se respinge întregul lot;
 - Mortalitatea sub 5 % la populația de cultură în perioada de șapte zile premergătoare transferului în sistemul de testare: se acceptă lotul.
20. Peștii nu ar trebui să beneficieze de tratament pentru boli în perioada de două săptămâni de aclimatare dinaintea testului și în perioada de expunere, iar tratarea bolilor ar trebui să fie complet evitată, dacă este posibil. Peștii cu semne clinice de boală nu ar trebui utilizați în cadrul studiului. Ar trebui să fie păstrată o evidență a observațiilor și a oricăror tratamente profilactice și terapeutice în perioada de cultură premergătoare testului.

21. Faza de expunere ar trebui să fie inițiată cu pești adulți având sexul genetic stabilit, care sunt dismorfici sexual, din rezerva laboratorului de animale mature din punct de vedere reproductiv și crescute la o temperatură de 25 ± 2 °C. Peștii ar trebui identificați ca reproducători dovediți (și anume, să fi produs progenituri viabile) în săptămâna premergătoare expunerii. Pentru întregul grup de pești utilizat în cadrul testului, intervalul greutăților individuale pe sexe la începutul testului ar trebui menținut în limitele de ± 20 % din media aritmetică a greutății la același sex. Un subeșantion de pești ar trebui cântărit înainte de test pentru a estima greutatea medie. Peștele selecționat ar trebui să fie de cel puțin 12 sdf, având o greutate de ≥ 300 mg în cazul femelelor și de ≥ 250 mg în cazul masculilor.

TIPUL TESTULUI

Concentrații de testare

22. Se recomandă utilizarea a cinci concentrații de substanțe chimice, plus martor(i). Toate sursele de informații ar trebui să fie luate în considerare atunci când se selectează intervalul concentrațiilor de testare, inclusiv relațiile cantitative structură-activitate (QSAR), datele extrapolate din teste analoage, rezultatele testelor pe pești, cum ar fi testele privind mortalitatea acută (capitolul C.1 din prezenta anexă), testul de reproducere a peștilor pe termen scurt (capitolul C.48 din prezenta anexă) și alte metode de testare, de exemplu, capitolele C.15, C.37, C.41, C.47 sau C.49 din prezenta anexă (21) (22) (23) (24) (25) (26), dacă există, sau, dacă este necesar, dintr-un test de stabilire a intervalului care ar putea include o fază de reproducere. Dacă este necesar, testul de stabilire a intervalului poate fi efectuat în condiții (calitatea apei, sistemul de testare, aportul de animale) similare cu cele utilizate pentru testul definitiv. În cazul în care este necesară utilizarea unui solvent și nu sunt disponibile date istorice, testul de stabilire a intervalului poate fi utilizat pentru identificarea caracterului adecvat al solventului. Concentrația cea mai mare de testare nu ar trebui să depășească solubilitatea în apă, 10 mg/l sau 1/10 din 96h-LC50 (27). Concentrația cea mai scăzută ar trebui să fie un factor de 10 până la 100 de ori mai mic decât cea mai mare concentrație. Utilizarea a cinci concentrații în cadrul acestui test permite nu numai măsurarea relațiilor doză-răspuns, ci și determinarea concentrației celei mai scăzute pentru care este observat un efect (LOEC) și CFEO, care sunt necesare pentru evaluarea riscurilor în cadrul anumitor programe sau jurisdicții de reglementare. În general, factorul de separare dintre concentrații nominale ale substanței chimice de testat între niveluri de tratament adiacente este $\leq 3,2$.

Duplicate în cadrul grupurilor de tratament și al martorilor

23. Ar trebui să fie utilizate minim șase camere de testare duplicate pentru fiecare concentrație de testare (a se vedea apendicele 7). În faza de reproducere (cu excepția generației F0),

structura de replicare este dublată pentru evaluarea fecundității și fiecare duplicat are doar o singură pereche de reproducție (a se vedea punctul 42).

24. Pe lângă concentrațiile de testat, ar trebui să fie supuse testării un martor apă de diluție și, dacă este necesar, un martor solvent. Ar trebui să se utilizeze un număr dublat de camere duplicate pentru martori pentru a asigura o putere statistică adecvată (și anume, pentru martori ar trebui să fie utilizate cel puțin douăsprezece duplicate). În faza de reproducere, numărul duplicatelor din martori sunt dublate (și anume, minim 24 de duplicate și fiecare duplicat are o singură pereche de reproducție). În urma reproducerii, duplicatele martori ar trebui să conțină cel mult 20 de embrioni (pește).

PROCEDURA

Începerea testului

25. Peștele adult activ din punct de vedere reproductiv, care este utilizat pentru începerea generației F0 în cadrul testului, este selectat pe baza a două criterii: vârsta (de obicei peste 12 sdf, dar se recomandă să nu se depășească 16 sdf) și greutatea (ar trebui să fie de ≥ 300 mg în cazul femelelor și de ≥ 250 mg în cazul masculilor).
26. Perechile femele-masculi care corespund specificațiilor de mai sus sunt mutate ca perechi individuale în fiecare duplicat din bazin, și anume douăsprezece duplicate în martori și șase duplicate în tratamente chimice la începutul testului. Acestor bazine li se distribuie în mod aleatoriu un tratament (de exemplu, T1-T5 și martor) și un duplicat (de exemplu, A-L la martori și A-F la tratament), iar apoi sunt introduse în sistemul de expunere cu debitul adecvat pentru fiecare bazin.

Condiții de expunere

27. Apendicele 3 cuprinde o prezentare completă a parametrilor și condițiilor de testare. Respectarea acestor specificații ar trebui să aibă drept rezultat existența unor valori ale punctelor finale la peștii martor similare cu cele enumerate în apendicele 4.
28. În timpul testului, oxigenul dizolvat, pH-ul și temperatura ar trebui să fie măsurate în cel puțin un vas de testare al fiecărui grup de tratament și martor. Ca și cerințe minime, aceste măsurători, cu excepția temperaturii, ar trebui efectuate o dată pe săptămână în perioada de expunere. Temperatura medie a apei pe întreaga durată a studiului ar trebui să fie cuprinsă între 24°C și 26°C pe parcursul testării. Temperatura ar trebui să fie măsurată în fiecare zi în perioada de expunere. pH-ul apei ar trebui să fie cuprins în intervalul 6,5-8,5, dar pe durata unui anumit test, acesta ar trebui să se încadreze într-un interval de $\pm 0,5$ unități. Duplicatele în cadrul unui tratament nu ar trebui să fie diferite unele față de altele din punct de vedere statistic, iar grupurile de tratament din cadrul testului nu ar trebui să fie

diferite unele față de altele din punct de vedere statistic (pe baza măsurătorilor de temperatură zilnice și excluzând abaterile de scurtă durată).

Durata expunerii

29. Testul expune pești reproducători sexual din generația F0 timp de trei săptămâni. În săptămâna 4, aproximativ în ziua de testare 24, se stabilește F1, iar perechile de reproducție F0 sunt eutanasiate, fiind înregistrate greutatea și lungimea (a se vedea punctul 34). Aceasta este urmată de expunerea generației F1 timp de alte 14 săptămâni (în total 15 săptămâni pentru generația F1) și a generației F2 timp de două săptămâni până la eclozare. Durata totală a testului este de 19 săptămâni (și anume, până la eclozarea F2). Calendarele pentru testare sunt prezentate în tabelul 2 și explicate în detaliu în apendicele 9.

Regimul de hrănire

30. Peștii pot fi hrăniți cu creveți în saramură *Artemia* spp. (larve nauplii de 24 de ore) *ad libitum*, fiind asigurat un supliment de hrană sub formă de fulgi din comerț, dacă este necesar. Hrana sub formă de fulgi din comerț ar trebui analizată în mod regulat pentru detectarea contaminanților precum pesticidele organoclorurate, hidrocarburile aromatice policiclice (HAP), bifenilii policlorurați (PCB). Ar trebui să se evite produsele alimentare cu un nivel ridicat de substanțe active endocrin (și anume fitoestrogeni) care ar putea compromite răspunsul testului. Hrana neconsumată și materiile fecale ar trebui înlăturate din vasele de testare, după caz, de exemplu prin curățarea cu atenție a fundului fiecărui bazin cu ajutorul unui sifon. Părțile laterale și partea inferioară a fiecărui bazin ar trebui, de asemenea, să fie curățate o dată sau de două ori pe săptămână (de exemplu, prin răzuire cu o spatulă). Un exemplu de program de hrănire se găsește în apendicele 5. Rata de hrănire depinde de numărul de pești per duplicat. Prin urmare, se reduce rata de hrănire dacă există cazuri de mortalitate într-un duplicat.

Determinare analitică și măsurători

31. Înainte de începerea perioadei de expunere, ar trebui asigurată funcționarea corespunzătoare a sistemului de alimentare cu substanța chimică. Ar trebui stabilite toate metodele analitice necesare, inclusiv cunoștințe suficiente privind stabilitatea substanței chimice în cadrul sistemului de testare. În timpul testării, concentrațiile substanței chimice de testare se determină la intervale adecvate, de preferință cel puțin o dată pe săptămână, într-un duplicat, pentru fiecare grup de tratament, cu rotire între duplicate din cadrul aceluiași grup de tratament în fiecare săptămână.
32. În timpul testării, debitele diluantului și ale soluției mamă ar trebui verificate periodic în mod corespunzător (de exemplu, cel puțin de trei ori pe săptămână). Se recomandă ca rezultatele să fie bazate pe concentrații măsurate. Însă, în cazul în care concentrația

substanței chimice de testat în soluție a fost menținută la un nivel satisfăcător în intervalul $\pm 20\%$ din media valorilor măsurate pe durata testului, atunci rezultatele pot fi bazate fie pe valorile nominale, fie pe valorile măsurate. În cazul substanțelor chimice care se acumulează în pești în mod semnificativ, concentrațiile de testare pot scădea pe măsură ce peștii cresc. În astfel de cazuri, se recomandă ca rata de reînnoire a soluției de testat din fiecare cameră să fie adaptată pentru a menține concentrațiile de testare cât mai constant posibil.

Observații și puncte finale măsurate

33. Punctele finale măsurate includ fecunditatea, fertilitatea, eclozarea, creșterea și supraviețuirea pentru evaluarea unor posibile efecte asupra populației. De asemenea, ar trebui să se emită zilnic observații cu privire la comportament, iar orice comportament neobișnuit ar trebui să fie notat. Alte puncte finale mecanistice includ nivelurile mRNA hepatice ale *vtg* sau nivelurile de proteine VTG determinate prin imunodozare (28), markeri fenotipici sexuali, cum ar fi papilele înotătoarelor anale caracteristice masculilor, evaluarea histologică a sexului gonadal și evaluarea histopatologică a rinichilor, ficatului și gonadei (a se vedea lista punctelor finale din tabelul 1). Toate aceste puncte finale specifice sunt evaluate în contextul determinării sexului genetic al individului, pe baza prezenței sau absenței sexului masculin la specia medaka, ce determină valoarea *dmy* a genei (a se vedea punctul 41). În plus, este evaluat timpul necesar pentru reproducere. În plus, pot fi derivate raporturi sexuale fenotipice simple pe baza informațiilor obținute din numărarea papilelor înotătoarelor anale pentru ca fiecare pește medaka să fie identificat ca fiind fie mascul, fie femelă fenotipică. Nu ar fi de așteptat ca prin această metodă de testare să se detecteze abaterile modeste din rata de sex preconizată, deoarece numărul relativ mic de pești per duplicat nu va asigura o suficientă putere statistică. De asemenea, în cursul evaluării histopatologice, gonada este evaluată și sunt efectuate analize mult mai pertinente pentru evaluarea fenotipului gonadei în contextul sexului genetic.
34. Scopul principal al acestei metode de testare este de a evalua efectele potențiale relevante asupra populației ale unei substanțe chimice de testat. Punctele finale mecaniciste (VTG, SSC și anumite efecte histopatologice ale gonadelor) pot, de asemenea, să contribuie la determinarea măsurii în care orice efect este mediat prin intermediul activității endocrine. Însă, aceste puncte finale mecanistice pot fi, de asemenea, influențate de probleme sistemice sau alte tipuri de toxicitate. În consecință, histopatologia ficatului și a rinichilor poate fi, de asemenea, evaluată în detaliu, pentru a contribui la o mai bună înțelegere a oricăror răspunsuri de la nivelul punctelor finale mecaniciste. Însă, chiar dacă nu sunt efectuate aceste evaluări detaliate, anomaliile brute observate incidental în evaluarea histopatologică ar trebui totuși observate și raportate.

Eutanasierea peștilor

35. La finalul expunerii generațiilor F0 și F1, atunci când se constituie sub-eșantioane de pești subadulți, peștii ar trebui să fie eutanasiați cu cantități adecvate de soluție anestezică [de exemplu, metan sulfonat de tricaină, MS-222 (CAS.886-86-2), 100-500 mg/l] cu o soluție tampon de 300 mg/l NaHCO₃ (bicarbonat de sodiu, CAS.144-55-8) pentru a reduce iritația membranei mucoase. În cazul în care peștii manifestă semne de suferință considerabilă (se poate prezice în mod sigur suferința foarte gravă și decesul) și considerați se consideră că aceștia sunt muribunzi, animalele ar trebui anesteziate și eutanasiate și tratate drept mortalitate în scopul analizei datelor. Atunci când un pește este eutanasiat din cauza morbidității, acest aspect ar trebui observat și raportat. În funcție de momentul în care peștele este eutanasiat în timpul studiului, se poate proceda la reținerea peștelui pentru analiza histopatologică (fixarea peștelui pentru o posibilă histopatologie).

Manipularea ouălor și a larvelor de pește

Colectarea ouălor de la perechile de reproducție pentru a propaga următoarea generație

36. Colectarea ouălor se face în prima zi (sau în primele două zile, dacă este necesar) a săptămânii de testare 4 pentru a trece de la F0 la F1 și a săptămânii de testare 18 pentru a trece de la F1 la F2. Săptămâna de testare 18 corespunde peștilor adulți din generația F1, 15 sdf (săptămâni după fertilizare). Este important ca toate icrele să fie eliminate din fiecare bazin cu o zi înainte de începerea colectării acestora pentru a asigura faptul că toate icrele colectate de la o pereche de reproducție provin de la o singură depunere de icre. În urma depunerii icrelor, femelele medaka își poartă uneori icrele aproape de anus până când acestea pot fi depozitate pe un substrat. În absența unui substrat în bazin, icrele se găsesc fie atașate de o femelă, fie pe partea inferioară a bazinului. În funcție de locul în care se află, icrele sunt fie îndepărtate cu grijă de femelă, fie sifonate de la partea inferioară în săptămâna de testare 4 a generației F0 și în săptămâna de testare 18 a generației F1. Toate icrele colectate în cadrul unui tratament sunt adunate la un loc înainte de a fi distribuite la camerele de incubare.
37. Filamentele din ouă, care țin ouăle depuse laolaltă, ar trebui îndepărtate. Icrele fertilizate (maxim 20) sunt colectate de la fiecare pereche de reproducție (1 pereche per duplicat), sunt adunate la un loc prin tratament și distribuite în mod sistematic în camere de incubare corespunzătoare (apendicele 6, 7). Cu ajutorul unui microscop de disecție de bună calitate, se pot vedea semnele fertilizării/dezvoltare precoce, cum ar fi ridicarea membranei de fertilizare (corion), diviziunea celulară continuă sau formarea blastulei. Camerele de incubare pot fi introduse în acvarii de tip „incubator” montate separat pentru fiecare tratament (caz în care trebuie să se măsoare parametrii de calitate a apei și concentrațiile substanței chimice de testat în acestea) sau în acvariul cu duplicate în care vor fi păstrate larvele eclozate (*de exemplu*, embrionul eclozat) vor fi limitate. În cazul în care este necesară o a doua zi de colectare (ziua de testare 23), toate icrele din ambele zile ar trebui

să fie grupate și apoi redistribuite în mod sistematic în fiecare dintre duplicatele pentru tratament.

Creșterea icrelor până la eclozare

38. Icrele fertilizate sunt agitate în mod continuu, *de exemplu*, în incubatorul de icre prin intermediul bulelor de aer sau prin balansarea verticală a incubatorului de icre. Mortalitatea icrelor fertilizate (embrionilor) este verificată și înregistrată zilnic. Icrele moarte sunt scoase din incubatoare (apendicele 9). În a șaptea zi după fertilizare (zdf), agitarea este oprită sau redusă astfel încât icrele fertilizate să se depună pe partea inferioară a incubatorului. Astfel se promovează eclozarea, de regulă în următoarea sau următoarele două zile. Pentru fiecare tratament și martor, sunt numărate larvele (larve tinere; embrioni eclozați) (baza de duplicate). Ouăle fertilizate care nu au eclozat până în perioada echivalentă cu dublul zilei mediane a incubației din martor (de regulă, 16 sau 18 zdf) se consideră neviabile și sunt eliminate.
39. În fiecare bazin duplicat se transferă douăsprezece larve. Larvele din camerele de incubație sunt grupate și distribuite în mod sistematic în bazine duplicate (apendicele 7). Acest lucru se poate realiza prin selectarea aleatorie a unei larve din rezerva de tratament și prin adăugarea secvențială a unei larve, printr-o extragere nediferențiată, într-un acvariu duplicat. Fiecare din bazine ar trebui să conțină un număr egal ($n = 12$) de larve eclozate (maximum 20 de larve fiecare). Dacă nu există suficiente larve pentru a umple toate duplicatele pentru tratament, se recomandă să se asigure un număr cât mai mare posibil de duplicate cu 12 larve. Larvele pot fi manipulate în condiții de siguranță cu pipete din sticlă cu diametru mare. Larvele suplimentare sunt eutanasiate cu anestezici. Pe parcursul celor câteva săptămâni anterioare formării perechilor de reproducție, ar trebui să se înregistreze ziua în care se observă primul eveniment de reproducere în fiecare duplicat.

Formarea perechilor de reproducție

Tăierea înotătoarelor și determinarea sexului genotipic

40. Determinarea sexului genotipic prin tăierea unor părți din înotătoare se realizează la 9-10 sdf (și anume, săptămâna de testare 12-13 pentru generația F1). Toți peștii dintr-un bazin sunt anesteziați (folosind metode aprobate, de exemplu, IACUC) și se prelevă o mică probă de țesut din extremitatea dorsală sau ventrală a înotătoarei caudale a fiecărui pește pentru a determina sexul genotipic al exemplarului (29). Peștii dintr-un duplicat pot fi adăpostiți în cuști mici, dacă este posibil unul în fiecare cușcă, în bazinul duplicat. În mod alternativ, doi pești pot fi ținuti în fiecare cușcă dacă se pot diferenția unul de celălalt. Una dintre metode este de să se taie în mod diferențiat înotătoarea caudală (*de exemplu*, extremitatea dorsală față de cea ventrală) atunci când se prelevă proba de țesut.

41. Sexul genotipic al speciei medaka este determinat de o genă identificată și încadrată într-un șir (*dmy*) care este situată pe cromozomul Y. Prezența *dmy* indică un exemplar XY, indiferent de fenotip, iar absența *dmy* indică un exemplar XX, indiferent de fenotip (30); (31). Acidul dezoxiribonucleic (ADN) din fiecare tăiere a înotătoarei este extrasă, iar prezența sau absența *dmy* poate fi determinată prin metode de reacție în lanț a polimerazei (PCR) (a se vedea apendicele 9 din capitolul C.41 din prezenta anexă sau apendicele 3 și 4 de la punctul 29).

Stabilirea perechilor de reproducție

42. Informațiile privind sexul genotipic sunt utilizate pentru a stabili perechile de reproducție XX-XY, indiferent de fenotipul extern care poate fi modificat prin expunerea la o substanță chimică de testat. În ziua următoare celei în care se determină sexul genotipic al fiecărui pește, se aleg în mod aleatoriu doi pești XX și doi pești XY provenind din fiecare duplicat și se stabilesc două perechi de reproducție XX-XY. În cazul în care un duplicat nu are doi pești XX sau doi pești XY, ar trebui să se obțină pești adecvați din alte duplicate în cadrul tratamentului. Prioritatea este de a obține numărul recomandat de perechi de reproducție duplicate (12) pentru fiecare tratament și pentru martori (24). Peștii cu anomalii evidente (probleme ce țin de vezica urinară, deformări ale coloanei vertebrale, variații de mărime extreme etc.) ar fi excluși de la stabilirea perechilor de reproducție. În faza de reproducere pentru F1, fiecare bazin duplicat ar trebui să conțină numai o pereche de reproducție.

Eșantionarea subadultilor și evaluarea punctelor finale

Eșantionarea peștilor din perechea de non-reproducție

43. După constituirea perechilor de reproducție, peștii neselectați pentru reproducere ulterioară sunt eutanasiați pentru măsurarea punctelor finale ale subadultilor în săptămâna de testare 12-13 (F1). Este extrem de important ca peștii să fie manipulați în așa fel încât sexul genotipic determinat pentru selecția perechilor de reproducție să poată fi încă depistat la un exemplar. Toate datele colectate sunt analizate în contextul sexului genotipic al peștelui specific. Fiecare pește este utilizat pentru o varietate de măsurători ale punctelor finale, inclusiv: determinarea ratelor de supraviețuire în cazul peștilor tineri/subadulti (săptămânile de testare 7-12/13 (F1), a creșterii în lungime (se poate măsura lungimea standard dacă înotătoarea caudală a fost scurtată ca urmare a prelevării de probe pentru analiza sexului genetic. Lungimea totală poate fi măsurată în cazul în care numai o porțiune a înotătoarei caudale, cea dorsală sau ventrală, este eșantionată pentru *dmy*, precum și masa corporală (și anume, masa umedă, uscare prin tamponare), valoarea mRNA a *vtg* (sau VTG) și papilele anale ale înotătoarelor (a se vedea tabelele 1 și 2). Este de precizat că greutatea și lungimea perechilor de reproducție sunt necesare, de asemenea, pentru calcularea creșterii medii în cadrul unui grup supus tratamentului.

Eșantionarea țesutului și măsurarea vitelogeninei

44. Ficatul este disecat și ar trebui să fie păstrat la ≤ -70 °C până la măsurarea mRNA a *vtg* (sau VTG). Coadă peștelui, inclusiv înotătoarea anală, este păstrată într-o soluție fixativă adecvată (de exemplu, Davidson's) sau fotografiată astfel încât papilele înotătoarei anale să fie luate în calcul la o dată ulterioară. [Dacă se dorește, pot fi prelevate alte țesuturi (și anume, gonada) și păstrate în acest moment.] Concentrația VTG din ficat ar trebui să fie cuantificată printr-o tehnică ELISA omoloagă (a se vedea procedurile recomandate pentru medaka în apendicele 6 din capitolul C.48 din prezenta anexă). În mod alternativ, metodele pentru cuantificarea valorii mRNA a *vtg*, și anume, extragerea mRNA a genei *vtg I* dintr-o probă de ficat și cuantificarea numărului copiilor genei *vtg I* (per ng de mRNA total) prin reacția PCR cantitativă, au fost stabilite de Agenția SUA pentru protecția mediului (29). În locul determinării numărului de copii ale genei *vtg* în grupurile martor și de tratament, o metodă mai accesibilă din punctul de vedere al resurselor și mai puțin dificilă din punct de vedere tehnic va stabili modificarea relativă (multiplicarea) a expresiei *vtg I* în grupurile martor și de tratament.

Caracteristici sexuale secundare

45. În condiții normale, numai peștii medaka masculi care sunt maturi din punct de vedere sexual sunt prevăzuți cu papile care se dezvoltă pe plăcile unite ale anumitor raze ale înotătoarei anale ca o caracteristică sexuală secundară, oferind un posibil marker biologic pentru efectele perturbatoare ale sistemului endocrin. Metoda de contabilizare a papilelor înotătoarei anale (numărul de plăci unite cu papile) este prezentată în apendicele 8. De asemenea, numărul papilelor înotătoarei anale per exemplar este utilizat pentru a clasifica respectivul exemplar ca și mascul sau femelă fenotipic(ă) la nivel extern în vederea calculării unui raport al sexului simplu per duplicat. Un pește medaka cu orice număr mai mare de 0 este definit ca fiind mascul; un pește medaka cu zero papile ale înotătoarei anale este definit ca fiind femelă.

Evaluarea fecundității și a fertilității

46. Fecunditatea și fertilitatea sunt evaluate în săptămânile de testare 1-3 la generația F0 și în săptămânile de testare 15-17 la generația F1. Ouăle sunt colectate zilnic pentru fiecare pereche de reproducție timp de 21 de zile consecutiv. Ouăle sunt ușor eliminate de la femelele prinse în plasă și/sau sifonate de la partea inferioară a acvariului în fiecare dimineață. Fecunditatea și fertilitatea sunt înregistrate zilnic pentru fiecare pereche de reproducție duplicat. Fecunditatea este definită ca fiind numărul de ouă depuse, iar fertilitatea este definită din punct de vedere funcțional ca fiind numărul de ouă fertilizate și viabile în momentul numărării. Numărătoarea ar trebui efectuată cât mai curând posibil după colectarea ouălor.

47. Fecunditatea duplicată este înregistrată zilnic ca fiind numărul de ouă per pereche de reproducție care se analizează prin procedurile statistice recomandate folosind mediile duplicate. Fertilitatea duplicată reprezintă suma numărului de ouă fertile produse de o pereche de reproducție împărțită la suma numărului de ouă produse de perechea respectivă. Din punct de vedere statistic, fertilitatea este analizată ca procent per duplicat. Capacitatea de eclozare duplicată este numărul de larve împărțit la numărul de embrioni încărcăți (de regulă, 20). Din punct de vedere statistic, capacitatea de eclozare este analizată ca procent per duplicat.

Eșantionarea adulților și evaluarea punctelor finale

Eșantionarea peștilor din perechea de reproducție

48. După săptămâna de testare 17 (și anume, după lansarea cu succes a generației F2), adulții F1 sunt eutanasiați și se evaluează diverse puncte finale (a se vedea tabelele 1 și 2). Înotătoarea anală este procesată imagistic pentru evaluarea papilelor înotătoarei anale (a se vedea apendicele 8) și/sau coada, imediat din spatele anusului, este îndepărtată și fixată pentru numărarea ulterioară a papilelor. O porțiune a înotătoarei caudale poate fi eșantionată și arhivată în acest moment pentru verificarea sexului genetic (*dmy*), dacă se dorește. Dacă este necesar, se poate preleva o probă de țesut pentru a repeta analiza *dmy* pentru verificarea sexului genetic al anumitor pești. Se deschide cavitatea corpului pentru a permite perfuzarea cu soluții fixative adecvate (de exemplu, Davidson's) înainte de submersarea întregului corp în soluția fixativă. Însă, în cazul în care se parcurge o etapă adecvată de permeabilizare înainte de fixare, nu este necesar să se deschidă cavitatea corpului.

Histopatologie

49. Fiecare pește este evaluat histologic pentru patologie în țesutul gonadal (30); (29). Astfel cum este menționat la punctul 33, alte puncte finale mecanistice evaluate în cadrul acestui test (și anume, VTG, SSC și anumite efecte histopatologice ale gonadelor) pot fi influențate de toxicități sistemice sau de altă natură. În consecință, histopatologia ficatului și a rinichilor poate fi, de asemenea, evaluată în detaliu, pentru a contribui la o mai bună înțelegere a oricăror răspunsuri de la nivelul punctelor finale mecaniciste. Însă, chiar dacă nu sunt efectuate aceste evaluări detaliate, anomaliile brute observate incidental în evaluarea histopatologică ar trebui totuși observate și raportate. Ar putea fi avută în vedere „citirea de sus în jos” de la cel mai mare grup de tratament (comparativ cu martorul) la un tratament fără efect, însă se recomandă consultarea ghidului privind histopatologia (29). De regulă, toate probele sunt prelucrate/secționate, după care sunt citite de patolog. În cazul în care se utilizează o abordare de „citire de sus în jos”, se observă că procedura Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) aplică principiul bazat pe așteptarea conform căreia, pe măsură ce cresc nivelurile dozei, va crește, de asemenea, impactul

biologic (patologia). Prin urmare, se va pierde putere dacă se ia în considerare doar o singură doză, cea mai mare, fără dozele intermediare. În cazul în care nu este necesară o analiză statistică pentru a determina dacă doza mare nu produce efecte, atunci această abordare poate fi acceptabilă. Fenotipul gonadei este, de asemenea, derivat din această evaluare

Alte observații

50. MEOGRT furnizează date care pot fi utilizate (de exemplu, în cadrul unei abordări bazate pe forța probantă a datelor) pentru a evalua simultan cel puțin două tipuri generale de parcursuri ale răspunsurilor adverse (AOP) care culminează cu deficiența de reproducere: (a) parcursuri mediate de sistemul endocrin, implicând perturbarea axului hipotalamo-hipofizo-gonadal (HPG) endocrin; și (b) parcursurile care determină reduceri în ceea ce privește supraviețuirea, creșterea (lungime și greutate) și reproducerea prin toxicitate nemediată de sistemul endocrin. Punctele finale măsurate, de regulă, în testele de toxicitate cronică, cum ar fi testul privind întregul ciclu de viață și testul privind etapele de viață timpurii sunt, de asemenea, incluse în acest test și pot fi utilizate pentru a evalua pericolele prezentate atât de modurile de acțiune toxică nemediată de sistemul endocrin, cât și de parcursurile de toxicitate mediată de sistemul endocrin. În timpul testului, ar trebui să se emită zilnic observații cu privire la comportament, iar orice comportament neobișnuit ar trebui să fie notat. În plus, orice mortalitate ar trebui să fie înregistrată și ar trebui să fie calculată supraviețuirea până la sacrificarea peștilor (săptămâna 6/7), supraviețuirea după sacrificarea la eșantionul de subadulți (în 9-10 sdf) și supraviețuirea de la momentul realizării de perechi până la prelevarea de probe de la pești adulți.

Tabelul 1: Prezentarea punctelor finale ale MEOGRT*

Etapă de viață	Punct final	Generație
Embrion (2 sdf)	Eclozare (% și timp până la eclozare)	F1, F2
Exemplare tinere (4 sdf)	Supraviețuire	F1
Subadult (9 sau 10 sdf)	Supraviețuire	F1
	Creștere (lungime și greutate)	
	Vitelogenină (mRNA sau proteină)	
	Caracteristici sexuale secundare (papilă înotoătoare anală)	

	Procent sex extern	
	Timp până la prima depunere	
Adult (12-14 sdf)	Reproducere (fecunditate și fertilitate)	F0, F1
Adult (15 sdf)	Supraviețuire	F1
	Creștere (lungime și greutate)	
	Caracteristici sexuale secundare (papilă înotătoare anală)	
	Histopatologie (gonadă, ficat, rinichi)	

*Aceste puncte finale trebuie să fie analizate din punct de vedere statistic

CALENDAR

51. Un calendar pentru MEOGRT ilustrat în tabelul 2 arată testul. MEOGRT cuprinde 4 săptămâni de expunere la adulții din F0 și 15 săptămâni de expunere la generația F1, precum și perioada de expunere pentru cea de a doua generație (F2), până la ecloziune (2 sdf). Activitatea desfășurată pe parcursul MEOGRT este sintetizată în apendicele 9.

Tabelul 2: Calendarele pentru expunere și punctele finale de măsurare pentru MEOGRT.

Calendarul MEOGRT pentru expunere și puncte finale																			
F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																	1	2	
Săptămâna de	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Etapa de viață cheie				Embrion				Larve				Exemplare tinere				Subadult		Adult	
Puncte finale																			
Fecunditate	F ₀														F ₁				
Fertilitate	F ₀														F ₁				
Eclozare					F ₁													F ₂	
Supraviețuire						F ₁						F ₁					F ₁		
Creștere				F ₀								F ₁					F ₁		
Vitelogenină												F ₁							
Sex secundar												F ₁					F ₁		
Histopatologie																	F ₁		
Săptămâna de testare	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- Modelul experimental cuprinde 7 grupuri de duplicate
 - 5 pentru tratamente cu substanțe chimice de testat
 - 2 pentru tratamente cu martor (4, în cazul în care se utilizează solvent)
- Model în cadrul grupului
 - 12 duplicate pentru reproducere, patologie pentru adulți și SSC (săpt. 10-18)
 - 6 duplicate pentru eclozare, supraviețuire, vtg; și - SSC și creștere subadulți (săpt. 1-9)

SSC: caracteristici sexuale secundare;
Săpt.: săptămâni;
Vtg: vitelogenină

RAPORTAREA DATELOR

Analiza statistică

52. Întrucât sexul genotipic este determinat la toți peștii pentru testare, datele ar trebui să fie analizate separat pentru fiecare sex genotipic (și anume, masculi XY și femele XX). În cazul în care acest lucru nu este posibil, puterea statistică a oricărei analize va fi redusă considerabil. Analizele statistice ale datelor ar trebui, de preferință, să urmeze procedurile descrise în documentul OCDE intitulat „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application” (32) (Metode actuale de analiză statistică a datelor privind ecotoxicitatea: un ghid pentru aplicare) (32). Apendicele 10 oferă orientări suplimentare pentru analiza statistică.

53. Modelul testului și selecția testelor statistice ar trebui să permită existența unei puteri adecvate pentru detectarea schimbărilor de importanță biologică în punctele finale în cazul în care CFEO va fi raportată (32). Este posibil ca raportarea unor concentrații de efect și a unor parametri relevanți să depindă de un cadru de reglementare. Ar trebui să se identifice variația procentuală la fiecare punct final care este important de detectat sau estimat.

Modelul testului trebuie adaptat pentru a permite acest lucru. Este posibil să nu se aplice aceeași variație procentuală la toate punctele finale și să nu poată fi conceput un experiment fezabil care să îndeplinească aceste criterii pentru toate punctele finale. Prin urmare, este important ca atenția să fie îndreptată asupra punctelor finale pentru experimentul respectiv în vederea unei proiectări adecvate a experimentului. În apendicele 10 este disponibilă o diagramă statistică și orientări pentru a ajuta la tratarea datelor și la alegerea celui mai adecvat test sau model statistic pentru a fi utilizat. Pot fi utilizate alte abordări statistice, cu condiția ca acestea să fie justificate din punct de vedere științific.

54. Va fi necesar ca variațiile să fie analizate în cadrul fiecărui set de probe duplicat folosind analiza varianței sau procedurile tabelor de contingență, precum și metode adecvate și suficiente de analiză statistică pe baza acestei analize. Pentru a realiza o comparație multiplă între rezultatele obținute la concentrații individuale și cele pentru martori, se recomandă procedura de tip „step-down” (de exemplu, testul Jonckheere-Terpstra) pentru răspunsuri continue. În cazul în care datele nu sunt consecvente cu o relație concentrație-răspuns monotonă, ar trebui să se utilizeze testul Dunnett sau Dunn (după o transformare adecvată a datelor, dacă este necesar).
55. Pentru fecunditate, ouăle sunt numărate zilnic, dar pot fi analizate ca număr total de ouă sau ca măsură repetată. Apendicele 10 prezintă detaliile privind modul în care este analizat acest punct final. Pentru datele privind histopatologia, care sunt sub formă de punctaje de gravitate, a fost elaborat un nou test statistic, Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RISCABS) (33).
56. Ar trebui să fie raportate orice puncte finale observate în tratamentele chimice care sunt semnificativ diferite de martorii corespunzători.

Considerații privind analiza datelor

Utilizarea nivelurilor de tratament compromise

57. O serie de factori sunt luați în considerare atunci când se stabilește dacă un duplicat sau întregul tratament demonstrează toxicitate evidentă, iar acesta ar trebui să fie exclus de la analiză. Toxicitatea evidentă este definită ca > 4 cazuri de mortalitate în orice duplicat între 3 și 9 sdf, care nu poate fi explicată prin eroare tehnică. Alte semne ale toxicității evidente includ hemoragia, comportamentele anormale, modalitățile anormale de înot, anorexia și orice alte semne clinice de boală. În ceea ce privește semnele subletale de toxicitate, ar putea fi necesare evaluări calitative care ar trebui întotdeauna efectuate în raport cu un grup de martori dintr-un vas cu apă de diluție (exclusiv apă curată). În cazul în

care se observă toxicitatea evidentă la tratamentul (tratamentele) de la cel mai înalt nivel, se recomandă ca tratamentele respective să fie cenzurate de la analiză.

Martori solvent

58. Utilizarea unui solvent ar trebui avută în vedere doar ca ultimă soluție, după epuizarea tuturor celorlalte opțiuni de livrare a substanței chimice. În cazul utilizării unui solvent, ar trebui să se utilizeze concomitent o apă de diluție. La încheierea testului, ar trebui efectuată o evaluare a potențialelor efecte ale solventului. Aceasta se realizează printr-o comparație statistică între grupul de martori solvent și grupul de martori apă de diluție. Cele mai relevante puncte finale care trebuie luate în considerare în această analiză sunt factorii determinanți ai creșterii (greutate), deoarece aceștia pot fi afectați prin toxicități generalizate. În cazul în care se detectează diferențe semnificative din punct de vedere statistic la aceste puncte finale între grupul cu martor tratat cu apă de diluție și grupul cu martor tratat cu solvent, ar trebui să se recurgă la cea mai bună apreciere profesională pentru a determina dacă validitatea testului este compromisă. În cazul în care cei doi martori diferă, tratamentele expuse la substanța chimică ar trebui comparate cu martorul tratat cu solvent, cu excepția cazului în care se cunoaște faptul că se preferă o comparație cu martorul tratat cu apă de diluție. În cazul în care nu există diferențe semnificative din punct de vedere statistic între cele două grupuri cu martori, se recomandă ca tratamentele expuse la substanța chimică de testat să fie comparate cu cele ale grupului (grupul cu martor tratat cu solvent și grupul cu martor tratat cu apă de diluție), cu excepția cazului în care se cunoaște faptul că se preferă numai comparația cu grupul cu martor tratat cu apă de diluție sau cu grupul cu martor tratat cu solvent.

Raportul testului

59. Raportul testului ar trebui să includă următoarele:

Substanța chimică de testat: proprietăți de natură fizică și, dacă este relevant, proprietăți fizico-chimice;

- Date de identificare a substanței chimice.

Substanță monocomponentă:

- 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).

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 constituenților.

Specii de testare:

- numele științific, sușa, dacă există, sursa și metoda de colectare a ouălor fertilizate, precum și manipularea ulterioară.

Condiții de testare:

- Perioada (perioadele) de expunere la lumină;
- Modelul de testare (de exemplu, dimensiunea camerei, volumul materialului și al apei, numărul camerelor de testare și al duplicatelor, numărul larvelor pe duplicat);
- metoda de preparare a soluțiilor mamă și frecvența reînnoirii (ar trebui să se specifice agentul de solubilizare și concentrația sa, atunci când este folosit);
- metoda de dozare a substanței chimice de testat (*de exemplu*, pompe, sisteme de diluare);
- eficiența de recuperare a metodei și concentrațiile de testare nominale, limita de cuantificare, mediile valorilor măsurate și abaterile lor standard în vasele de testare și metoda prin care acestea au fost obținute, precum și dovezi că măsurătorile se referă la concentrațiile substanței de testat în soluție reală;
- caracteristicile apei de diluție: pH, duritate, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat, nivelul clorului rezidual (dacă a fost măsurat), carbonul organic total (dacă a fost măsurat), solide în suspensie (dacă au fost măsurate), salinitatea mediului de testare (dacă a fost măsurată) și alte măsurători făcute;
- concentrațiile de testare nominale, mediile valorilor măsurate și deviațiile standard ale acestora;
- calitatea apei din vasele de testare, pH, temperatură (zilnic) și concentrația oxigenului dizolvat;
- informații detaliate legate de hrană [de exemplu, tipul de alimente, sursa, cantitatea administrată și frecvența].

Rezultate:

- dovezi privind faptul că martorii au îndeplinit criteriile generale de validare;
- datele pentru martor (plus martorul tratat cu solvent atunci când este utilizat) și grupurile de tratament, după cum urmează, eclozarea (capacitatea de eclozare și timpul până la eclozare) pentru F1 și F2, rata de supraviețuire după eclozare pentru F1, creșterea (lungimea și greutatea corporală) pentru F1, sexul genotipic și diferențierea sexuală (de exemplu, caracteristicile sexuale secundare pe baza papilelor înotătoarelor anale și a

histologiei anale și gonadale) pentru F1, sexul fenotipic pentru F1, caracteristicile sexuale secundare (papilele înotoătoarelor anale) pentru valoarea mRNA a *vtg* (sau proteina VTG) pentru F1, evaluarea histopatologică (gonada, ficatul și rinichii) pentru F1 și reproducerea (fecunditate și fertilitate) pentru F0 , F1; (a se vedea tabelele 1 și 2).

- abordarea analizei statistice (analiza regresiei sau analiza varianței) și tratarea datelor (teste statistice și modele utilizate);
 - concentrația fără efect observat (CFEO) pentru fiecare răspuns evaluat;
 - concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) pentru fiecare răspuns evaluat (la $p = 0,05$); CE_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 ai modelului și erorile standard ale acestora.
 - Orice abatere de această metoda de testare și abateri de la criteriile de acceptare, precum și considerații privind eventualele consecințe asupra rezultatului testului.
60. Pentru rezultatele măsurărilor punctelor finale, ar trebui să fie prezentate valorile medii și deviațiile lor standard (în funcție de duplicat și concentrație, dacă este posibil).

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) OCDE (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 171), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.
- (1) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K și Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1-36.
- (2) OCDE (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 150), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.
- (3) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. *Water Research* 16: 457-464.
- (4) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T și Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1925-1930.
- (5) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T și Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2552-2560.
- (6) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H și Honjo T. (2002). Effects of 17 β -Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Chemosphere* 47: 71-80.
- (7) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H și Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1692-1698.
- (8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H și Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-Tert-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1487-1496.
- (9) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M și Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. *Aquatic Toxicology* 79: 288-295.

- (10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M și Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. *Aquatic Toxicology* 77: 78-86.
- (11) Nakamura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T și Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Journal of Applied Toxicology* 35:11-23.
- (12) Agenția SUA pentru protecția mediului (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Publicație disponibilă la adresa: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
- (13) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P și McLachlan M. (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.
- (14) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 23), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.
- (15) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ și Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Aquatic Toxicology* 76: 69-92.
- (16) Denny JS, Spehar RL, Mead KE și Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- (17) Koger CS, Teh SJ și Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287-1293.
- (18) Kinoshita M, Murata K, Naruse K și Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.
- (19) Gormley K și Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 330-338.
- (20) Capitolul C.15 din prezenta anexă, Pește, test de toxicitate pe termen scurt privind stadiul embrionar și de pești tineri.

- (21) Capitolul C.37 din prezenta anexă, Analiza de 21 de zile pentru pești: screening cu durată scurtă pentru detectarea activității estrogenice și androgenice și a inhibării aromatazei.
- (22) Capitolul C.41 din prezenta anexă, Testul de dezvoltare sexuală a peștilor.
- (23) Capitolul C.48 din prezenta anexă, Analiza reproducerii pe termen scurt la pești.
- (24) Capitolul C.47 din prezenta anexă, Pești, Testul de toxicitate în stadii de viață timpurii.
- (25) Capitolul C.49 din prezenta anexă, Testul de toxicitate acută la embrionii de pești (FET).
- (26) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L și Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067-1076.
- (27) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M și Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301-308.
- (28) OCDE (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 227). Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.
- (29) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M și Scharl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245-251.
- (30) Shinomiya, A, Otake H, Togashi K, Hamaguchi S și Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, *Zoological Science* 21: 613-619.
- (31) OCDE (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.
- (32) Green JW, Springer TA, Saulnier AN și Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108-1116.

Apendicele 1

DEFINIȚII

Substanță chimică: o substanță sau un amestec.

ELISA: test de imunoadsorbtie cu anticorpi marcați enzimatic

Fecunditate = numărul ouălor;

Fertilitate = numărul ouălor viabile/fecunditate;

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)

Capacitatea de eclozare = larve/numărul de embrioni încărcăți într-un incubator

IACUC: Comitetul pentru îngrijirea și utilizarea animalelor

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)

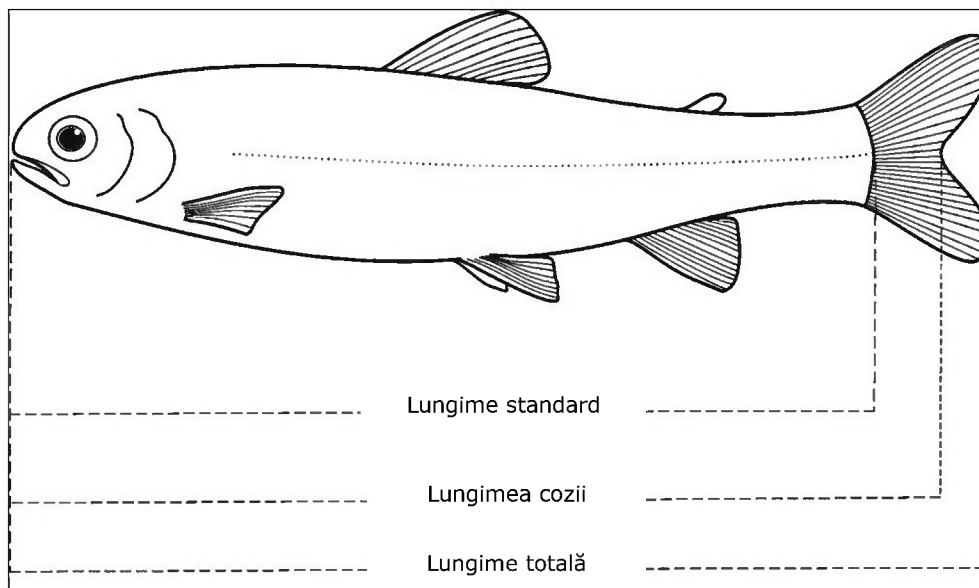


Figura 1: Descrierea diferitelor lungimi folosite

CEx: (concentrație efectivă pentru un efect x %) reprezintă concentrația care determină o valoare x % a unui efect asupra organismelor testate într-un timp de expunere dat în comparație cu un martor. De exemplu, o valoare EC50 este concentrația estimată să producă un efect asupra unui punct final de testare la 50% dintr-o populație expusă într-un timp de expunere stabilit.

Testul în regim dinamic este un test cu flux continuu de soluții de testare prin sistemul de testare în perioada de expunere.

Axa HPG: axul hipotalamo-hipofizo-gonadal.

IUPAC: Uniunea Internațională de Chimie Pură și Aplicată.

Rata de încărcare: greutatea umedă a peștelui per volum de apă.

Concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) este cea mai scăzută concentrație testată a unei substanțe chimice de testat la care se constată un efect de reducere semnificativ din punct de vedere statistic asupra creșterii (la $p < 0,05$) în comparație cu martorul. Însă toate concentrațiile de testare mai mari decât LOEC ar trebui să aibă un efect nociv egal cu sau mai mare decât cele observate la LOEC. Atunci când aceste două condiții menționate nu pot fi îndeplinite, ar trebui furnizată o explicație completă a modului de alegere a LOEC (și, prin urmare, CFEO). Apendicele 5 și 6 oferă orientări în acest sens.

Concentrația letală medie (LC50): este concentrația unei substanțe chimice de testat care este considerată letală la 50 % din organismele testate pe durata testului.

Concentrația fără efect observat (CFEO) este concentrația de testare imediat sub LOEC care, atunci când este comparată cu martorul, nu are niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) într-un timp de expunere stabilit.

SMILES: Specificație pentru înregistrarea simplificată a structurii moleculare sub formă de text liniar.

Densitatea populației: numărul de pești pe unitatea de volum de apă.

Substanță chimică de testat: orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

UVCB: substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

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.

SDF: săptămâni după fertilizare

Apendicele 2**ANUMITE CARACTERISTICI CHIMICE ALE APEI DE DILUȚIE ACCEPTABILE**

Substanță	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
Total pesticide organoclorurate plus bifenili policlorurați	50 ng/l
Total clor organic	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

CONDIȚII DE TESTARE PENTRU MEOGRT

1. Specii recomandate	Medaka japoneză (<i>Oryzias latipes</i>)
2. Tipul de testare	Continuu în regim dinamic
3. Temperatura apei	Temperatura nominală de testare este de 25 °C. Temperatura medie pe durata testului în fiecare bazin este de 24-26 °C.
4. Calitatea iluminatului	Becuri fluorescente (spectru larg și ~150 lumeni/m ²) (~150 lux). 16 h de lumină, 8 h de întuneric
6. Rata de încărcare	F0: 2 adulți/duplicat; F1: inițiată cu maxim 20 de ouă (embrioni) /duplicat, redusă la 12 embrioni /duplicat la eclozare, apoi 2 adulți (pereche de reproducție XX-XY) la 9-10 sdf pentru faza de reproducere
7. Volum minim utilizabil în camera de testare	1,8 l (de exemplu, dimensiunea camerei de testare: 18 x 9 x 15 cm)
8. Schimburile de volum ale soluțiilor de testare	Minim 5 reînnoiri de volum/zi până la maxim 16 reînnoiri de volum/zi (sau un debit de 20 ml/min)
9. Vârsta organismelor de testare la inițiere	F0: > 12 sdf, însă se recomandă să nu se depășească 16 sdf
10. Numărul de organisme per duplicat	F0: 2 pești (pereche mascul și femelă); F1: Maxim 20 pești (ouă)/duplicat (produși din perechi de reproducție F0 și F1).
11. Număr de tratamente	5 tratamente chimice de testare plus martorii (martorul) adecvat (adecvați)
12. Numărul de duplicate per tratament	Minimum 6 duplicate pe tratament pentru o substanță chimică de testat și minim 12 duplicate pentru martor și pentru martorul tratat cu solvent, dacă se utilizează (numărul de duplicate este dublu în faza de reproducere în F1)
13. Numărul de organisme per test	Cel puțin 84 de pești în F0 și 504 în F1. (în cazul în care se utilizează un martor tratat cu solvent, atunci se utilizează 108 pești în F0 și 648 de pești în F1). Unitatea numărată este cea rezultată după eclozarea embrionilor.
14. Regimul de hrănire	Peștii sunt hrăniți cu creveți de saramură, <i>Artemia</i> spp., (nauplii de 24 de ore) <i>ad libitum</i> , hrana fiind suplimentată de un tip de hrană sub formă de fulgi disponibilă în comerț, dacă este necesar (un exemplu de program de hrănire prin care să se asigure o creștere și o dezvoltare adecvate

pentru a sprijini o reproducere sigură se găsește în apendicele 6).

- | | |
|---------------------------------------|---|
| 15. Aerarea | Nu există, cu excepția cazului în care oxigenul dizolvat se apropie de < 60 % din valoarea de saturație în aer |
| 16. Apa de diluție | Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită sau apă de la robinet declorizată. |
| 17. Perioadă de expunere | În primul rând, 19 săptămâni (incubație de la F0 la F2) |
| 18. Puncte finale biologice (primare) | Capacitate de eclozare (F1 și F2); rata de supraviețuire [F1, de la eclozare la 4 sdf (sfârșitul etapei larvare/începutul etapei de pești tineri), de la 4 la 9 (sau 10) sdf (de la începutul etapei de pești tineri la etapa de subadult) și de la 9 la 15 sdf (de la etapa de subadult la încheierea etapei de adult)]; creștere (F1, lungime și greutate la 9 și 15 sdf); caracteristici sexuale secundare (F1, papilele înotătoarelor anale la 9 și 15 sdf); vitelogenină (F1, valoarea mRNA a <i>vlg</i> sau proteina VTG la 15 sdf); sexul fenotipic (F1, prin histologia gonadelor, la 15 sdf); reproducere (F0 și F1, fecunditate și fertilitatea timp de 21 de zile); timp până la depunere (F1); și histopatologia (F1, gonadă, ficat și rinichi la 15 sdf) |
| 19. Criterii de validitate a testului | Oxigen dizolvat de ≥ 60 % din valoarea saturației aerului; temperatura medie a apei de 24-26°C pe parcursul testului; reproducerea cu succes a unui procent de ≥ 65 % dintre femelele din soluțiile (soluția) martor; fecunditatea medie zilnică ≥ 20 de ouă la martor(i); capacitatea de eclozare ≥ 80 % (în medie) la martori (la fiecare dintre generațiile F1 și F2); supraviețuirea după eclozare până la 3 sdf ≥ 80 % (în medie) și de la 3 sdf până la încheiere pentru generația ≥ 90 % (în medie) la martori (F1), concentrațiile substanței chimice de testat în soluție ar trebui menținute în mod satisfăcător în intervalul ± 20 % din valorile medii măsurate. |

Apendicele 4

ORIENTĂRI PRIVIND VALORILE TIPICE ALE MARTORILOR

Ar trebui remarcat faptul că aceste valori ale martorilor se bazează pe un număr limitat de studii de validare și pot face obiectul unor modificări în lumina experienței viitoare.

Creștere

Sunt efectuate măsurători de greutate și de lungime pentru toți peștii eșantionați la 9 (sau 10) și la 15 săptămâni după fertilizare (sdf). Acest protocol va genera valori preconizate de greutate umedă, la 9 sdf, de 85-145 mg la masculi și 95-150 mg la femele. Valorile preconizate de greutate, la 15 sdf, sunt de 250-330 mg la masculi și de 280-350 mg la femele. Deși pot exista abateri semnificative de la aceste intervale pentru fiecare pește, valorile medii ale greutatei care se află în mod semnificativ în afara acestor intervale, în special cele mai scăzute, ar sugera probleme legate de hrănire, controlul temperaturii, calitatea apei, boli sau orice combinație a acestor factori.

Eclozare

Reușita eclozării la martori este, de regulă, de aproximativ 90 %, însă valorile scăzute precum 80 % nu sunt rare. Reușita eclozării sub 75 % poate indica agitarea insuficientă a ouălor în curs de dezvoltare sau atenția necorespunzătoare la manipularea ouălor, cum ar fi lipsa eliminării în timp util a ouălor moarte, ceea ce conduce la o infestare fungică.

Supraviețuire

Ratele de supraviețuire până la 3 sdf de la eclozare și după 3 sdf sunt, de regulă, de 90 % sau mai mult în cazul martorilor, dar ratele de supraviețuire reduse în primele stadii de viață, de 80 % în cazul martorilor, nu sunt alarmante. Ratele de supraviețuire în cazul martorilor care nu depășesc 80 % ar fi motive de îngrijorare și pot indica o curățare insuficientă a acvariilor, ceea ce determină pierderi de pești larvari prin îmbolnăvire sau sufocare din cauza nivelurilor scăzute de oxigen dizolvat. Mortalitatea poate să apară, de asemenea, ca urmare a unei vătămări în timpul curățării bazinului și prin pierderea de pești larvari în sistemul de evacuare al bazinului.

Gena vitelogenină

Deși nivelurile absolute ale genei *vitelogenine* (*vgt*) care sunt exprimate ca și copii/ng din totalul mRNA, pot varia semnificativ între laboratoare din cauza procedurilor sau a aparatelor utilizate, procentul *vgt* ar trebui să fie de aproximativ 200 de ori mai mare la femelele din soluția martor față de masculii din soluția martor. Nu este neobișnuit ca acest procent să fie între 1000 și 2000; însă procente mai mici de 200 sunt suspecte și pot indica probleme legate de contaminarea probelor sau probleme legate de procedura și/sau reactivii utilizați.

Caracteristici sexuale secundare

Pentru masculi, intervalul normal al caracteristicilor sexuale secundare, definit ca fiind numărul total de segmente în radiile papilelor înotătoarelor anale, este de 40-80 de segmente la 9-10 sdf. Până la 15 sdf, intervalul pentru masculii din soluția martor ar trebui să fie în jur de 80-120 și 0 pentru femelele din soluția martor. Din motive neexplicate, în cazuri rare, unii masculi nu dezvoltă papile până la împlinirea a 9 sdf dar, întrucât toți masculii din soluția martor dezvoltă papile până la împlinirea a 15 sdf, acest lucru se întâmplă, cel mai probabil, din cauza dezvoltării întârziate. Prezența papilelor la femelele din soluția martor indică prezența masculilor XX în populație.

Masculii XX

Incidența normală pe fond a masculilor XX în cultură pare a fi de aproximativ 4 % sau mai puțin la 25 °C, aceasta crescând odată cu creșterea temperaturii. Ar trebui să se ia măsuri pentru a se reduce la minim proporția de masculi XX în populație. Întrucât incidența masculilor XX pare să aibă o componentă genetică și, prin urmare, este ereditară, monitorizarea stocului de cultură și asigurarea că masculii XX nu sunt utilizați pentru a propaga stocul de cultură reprezintă un mijloc eficient de a reduce incidența masculilor XX în populație.

Activitatea de depunere a ouălor

Activitatea de depunere a ouălor în duplicatele martor ar trebui monitorizată zilnic înainte de evaluarea fecundității. Perechile din soluția martor pot fi evaluate din punct de vedere calitativ vizual pentru a obține dovezi privind activitatea de depunere a icrelor. Până la împlinirea a 12-14 sdf, majoritatea perechilor din soluția martor ar trebui să depună icre. Numărul redus de perechi de depunere a icrelor până la împlinirea acestei perioade indică existența unor posibile probleme legate de sănătatea, maturitatea sau bunăstarea peștilor.

Fecunditate

Peștii metaka sănătoși și bine hrăniți depun icre zilnic până la împlinirea perioadei de 12-14 sdf, producând între 15 și 50 de icre pe zi. În ceea ce privește producția de icre, 16 din cele 24 perechi de reproducere din soluția martor recomandate (> 65 %) ar trebui să producă mai mult de 20 de icre per pereche pe zi, putând ajunge până la aproximativ 40 de icre pe zi. O cantitate mai mică decât aceasta poate indica perechi de reproducție imature, malnutrite sau nesănătoase.

Fertilitate

Procentul de icre fertile pentru perechile de reproducere din soluția martor este, de regulă, situat în intervalul de 90 %, fiind frecvente valorile medii și cele superioare până la 90 %. Ratele de fertilitate mai mici de 80 % pentru icrele din soluția martor sunt suspecte și pot indica fie indivizi nesănătoși, fie condiții de cultură mai puțin ideale.

Apendicele 5

UN EXEMPLU DE PROGRAM DE HRĂNIRE

Un exemplu de program de hrănire pentru a asigura o creștere și dezvoltare adecvată în vederea susținerii unei reproduceri fiabile este prezentat în tabelul 1. Abaterile de la acest program de hrănire pot fi acceptabile, dar se recomandă ca acestea să fie testate pentru a se verifica dacă se respectă condiția de creștere și reproducere acceptabilă. Pentru a respecta programul de hrănire sugerat, înainte de începerea testului trebuie să se determine greutatea uscată a creveților în saramură pe volum de dejecții ale creveților respectivi. Acest lucru se poate realiza prin cântărirea unui volum definit de dejecții de creveți în saramură care au fost uscate timp de 24 de ore la 60 °C pe un recipient cântărit în prealabil. Pentru a ține seama de greutatea sărurilor din dejecții, un volum identic de aceeași soluție salină utilizată în dejecții ar trebui să fie, de asemenea, uscat, cântărit și scăzut din greutatea dejecțiilor în saramură uscate. În mod alternativ, creveții în saramură pot fi filtrați și clătiți cu apă distilată înainte de uscare, eliminând astfel necesitatea de a măsura greutatea unui „corp de sare”. Aceste informații sunt utilizate pentru a transforma informațiile din tabel din greutate uscată de creveți în saramură în volum de dejecții ale creveților în saramură utilizate individual ca hrană pentru pești. În plus, se recomandă ca părțile alicote din dejecțiile creveților în saramură să fie cântărite săptămânal pentru a se verifica greutatea uscată corectă a creveților în saramură utilizați ca hrană.

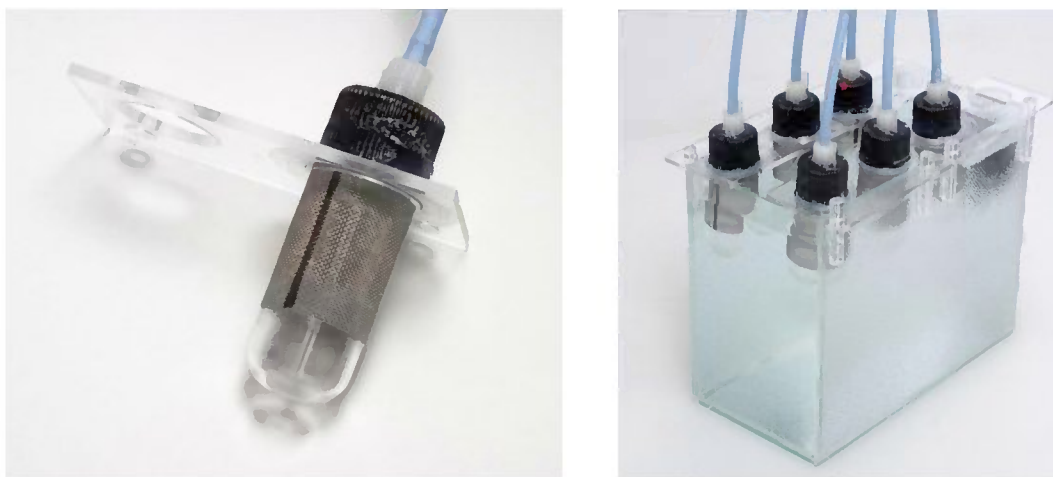
Tabelul 1: Exemplu de program de hrănire

Timp (după eclozare)	Creveți în saramură (greutate uscată în mg/pește/zi)
Ziua 1	0,5
Ziua 2	0,5
Ziua 3	0,6
Ziua 4	0,7
Ziua 5	0,8
Ziua 6	1,0
Ziua 7	1,3
Ziua 8	1,7
Ziua 9	2,2
Ziua 10	2,8
Ziua 11	3,5
Ziua 12	4,2
Ziua 13	4,5
Ziua 14	4,8
Ziua 15	5,2
Zilele 16-21	5,6
Săptămâna 4	7,7
Săptămâna 5	9,0
Săptămâna 6	11,0
Săptămâna 7	13,5
Săptămâna 8-sacrificare	22,5

Apendicele 6

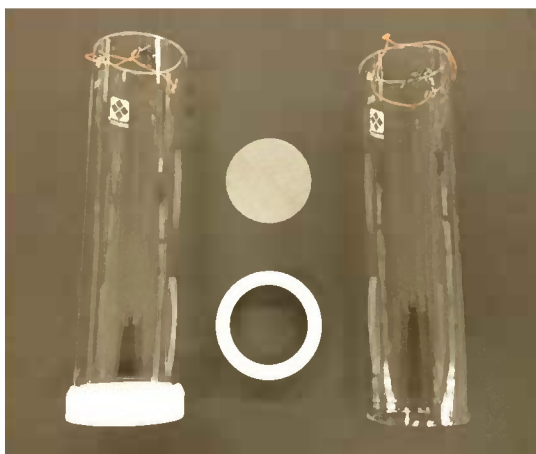
EXEMPLE DE CAMERĂ DE INCUBAȚIE A ICRELOR

Exemplul A



Acest incubator este format dintr-o eprubetă de centrifugă din sticlă secționată transversal, care este conectată printr-un manșon din oțel inoxidabil și fixată cu capacul cu filet al centrifugei. O eprubetă mică din sticlă sau din oțel inoxidabil este proiectată prin capac și este poziționată în apropierea părții inferioare rotunjite, formând ușor bule de aer pentru a suspenda icrele și pentru a reduce transmiterea între icre a infecțiilor saprofite fungice, facilitând totodată schimbul de substanțe chimice între incubator și rezervorul de păstrare.

Exemplul B



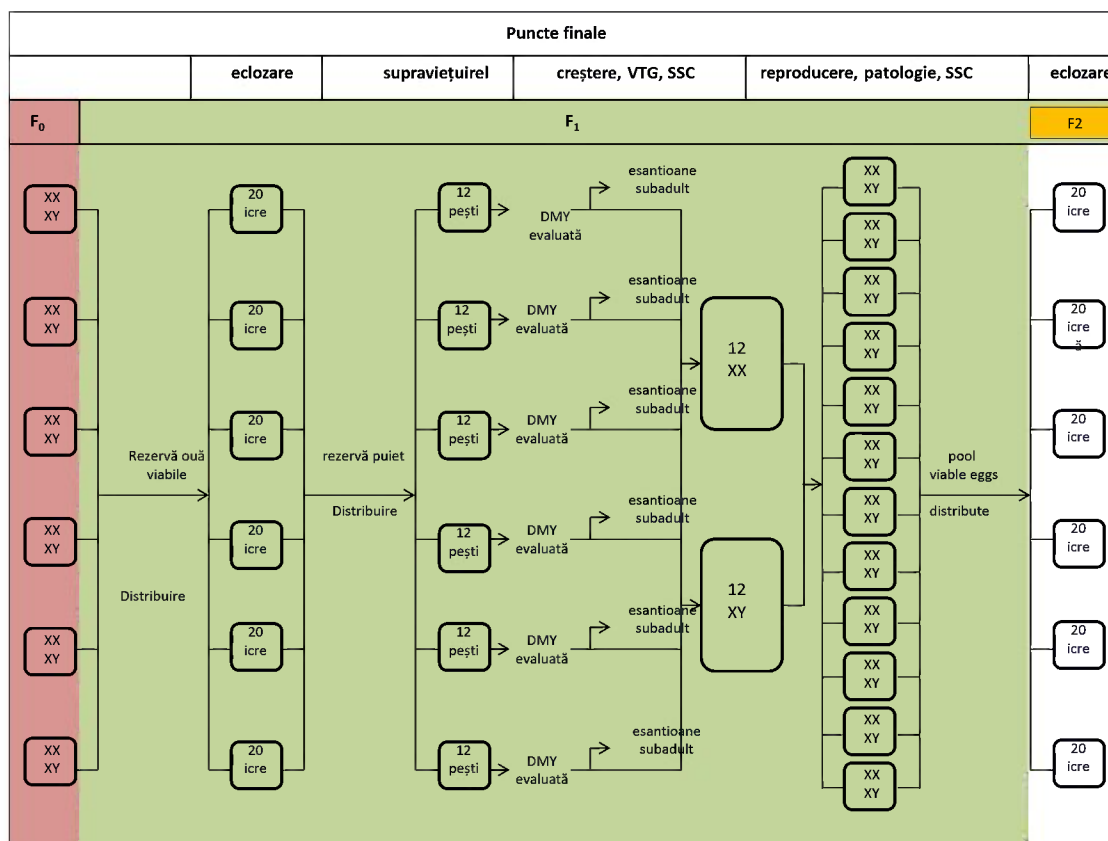


Acest incubator este format dintr-un corp cilindric din sticlă (cu diametru de 5 cm și înălțime de 10 cm) și dintr-o plasă metalică din oțel inoxidabil (0,25 ϕ și ochiul de plasă de 32) care este prinsă de partea inferioară a corpului cu un inel PTFE. Incubatoarele sunt suspendate de la bara de ridicare la bazine și se agită vertical (o amplitudine de aproximativ 5 cm) într-un ciclu corespunzător (aproximativ o dată la 4 secunde) pentru icrele de medaka.

Apendicele 7

SCHEMA GRUPĂRII ȘI POPULĂRII DUPLICATELOR PE PARCURSUL METODEI DE TESTARE MEOGRT

Figura 1: Gruparea și repopularea duplicatelor pe parcursul metodei MEOGRT. Cifra reprezintă un tratament sau ½ dintr-o soluție martor. Datorită grupării, identitatea duplicatelor nu este continuă pe parcursul testului. Este de precizat faptul că termenul „icre” se referă la icre viabile, fertilizate (echivalente cu embrioni).



Tratamente și duplicare.

Metoda de testare recomandă cinci tratamente cu substanțe chimice de testat utilizând material tehnic de calitate și un martor negativ. Numărul duplicatelor per tratament nu rămâne constant pe parcursul testului MEOGRT, iar numărul duplicatelor în tratamentul cu soluție martor este dublu față de orice tratament cu o substanță chimică de testat. La generația F₀, fiecare tratament cu substanțe chimice de testat are șase duplicate, iar tratamentul cu martor negativ are 12 duplicate. Recomandăm în mod insistent să nu se folosească solvenți, iar în caz contrar, în raportul MEOGRT ar trebui să se prezinte o justificare atât pentru utilizarea unui solvent, cât și pentru alegerea solventului. De asemenea, dacă se utilizează un solvent, sunt necesare două tipuri de martori: a) un martor tratat cu solvent și b) un martor negativ. Aceste două grupuri de martori ar trebui să

cuprindă fiecare o rezervă completă de duplicate în toate punctele perioadei de desfășurare a testului MEOGRT. Pe parcursul dezvoltării organismelor supuse testării din generația F1 (și F2, până la eclozare), această structură de duplicate rămâne aceeași. Însă, în stadiul de adult, atunci când se constituie perechile de reproducere în F1, numărul perechilor duplicat de reproducere pentru fiecare tratament se dublează în mod optim; prin urmare, există maxim 12 perechi de duplicate în cadrul fiecărui tratament cu substanțe chimice de testat și 24 de perechi de duplicate în grupul de martori (și alte 24 de perechi de duplicate în martorul tratat cu solvent, dacă este necesar). Momentul ecloziunii la embrionii depuși de perechile din F1 se determină pe aceeași structură de duplicate ca și în cazul embrionilor depuși de perechile din F0, ceea ce înseamnă inițial șase duplicate pentru fiecare tratament cu substanță chimică și 12 duplicate în grupul (grupurile) cu martori.

Apendicele 8

NUMĂRAREA PAPILELOR ÎNOTĂTOAREI ANALE

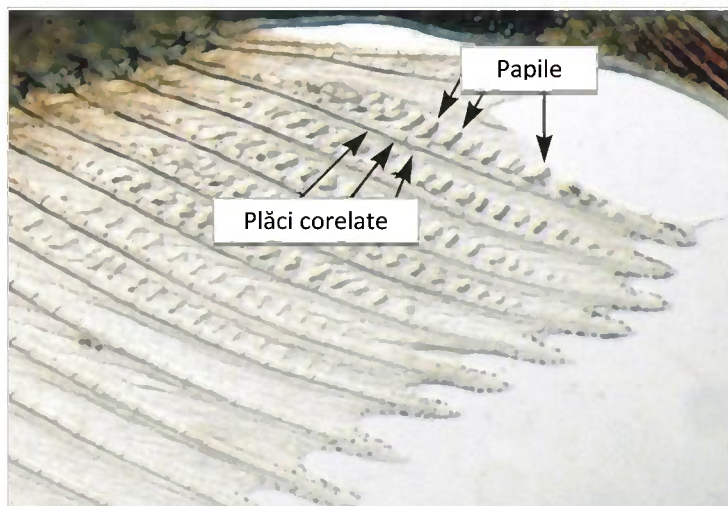
Materiale și reactivi principali

- Microscop de disecție (cu cameră video atașată opțional)
- Fixator [de exemplu, Davidson's (Bouin's nu este recomandat)], dacă numărătoarea nu este efectuată din imagine

Proceduri

După necropsie, înotătoarea anală ar trebui să fie procesată imagistic pentru a permite numărarea convenabilă a papilele înotătoarelor anale. Chiar dacă procesarea imagistică este metoda recomandată, înotătoarea anală poate fi fixată cu fixator Davidson's sau cu un alt fixator adecvat timp de aproximativ 1 minut. Este important ca înotătoarea anală să fie menținută la nivel plan în timpul fixării pentru a permite numărarea mai ușoară a papilelor. Carcasa cu înotătoarea anală poate fi păstrată în fixatorul Davidson's sau în alt fixator adecvat până la analiză. Se numără plăcile comune (a se vedea **figura 1**) cu papile care ies în afară din marginea posterioară a plăcii comune.

Figura 1: Papila înotătoarei anale)



Apendicele 9

CALENDARUL DETALIAT AL MEOGRT

Săptămânile de testare 1-3 (F0)

Peștii reproducători din generația F0, care au îndeplinit criteriile de selecție (a se vedea punctele 16-20) sunt expuși timp de trei săptămâni pentru a permite gameților și țesuturilor gonadale în curs de dezvoltare să fie expuse la substanța chimică de testat. Fiecare bazin duplicat găzduiește o singură pereche de pești de reproducere (pereche de reproducere cu femelă XX-mascul XY). Ouăle depuse sunt colectate, numărate și evaluate pentru fertilitate timp de 21 de zile consecutiv, începând cu ziua de testare 1.

Săptămâna de testare 14 (F0 și F1)

Este preferabil ca icrele (embrionii) fecundate (fecundați) și viabile (viabili) să fie colectate într-o singură zi; însă, în cazul în care nu există suficienți embrioni, embrionii pot fi colectați pe parcursul a două zile. Dacă au fost colectați timp de două zile, toți embrionii din cadrul tratamentelor care au fost colectați în prima zi sunt grupați cu cei colectați în a doua zi. Apoi toți embrionii grupați pentru fiecare tratament sunt distribuiți în mod aleatoriu în fiecare dintre incubatoarele duplicate la 20 de embrioni per incubator. Mortalitatea icrelor fertilizate (embrionilor) este verificată și înregistrată zilnic. Icrele moarte sunt scoase din incubatoare (moartea la icrele fertilizate poate fi reprezentată, în special în stadiile incipiente, printr-o pierdere semnificativă a translucidității și schimbarea colorației din cauza coagulării și/sau a precipitării proteinelor, rezultând un aspect alb-opac; OCDE 210).

Notă: În cazul în care un singur tratament necesită o a doua zi de colectare, toate tratamentele (inclusiv martorii) trebuie să urmeze această procedură. În cazul în care, după cea de a doua zi de colectare, există un număr insuficient de embrioni în cadrul unui tratament pentru a încărca 20 de embrioni per incubator, se reduce numărul de embrioni încărcați în cadrul respectivului tratamentului specific la 15 embrioni per incubator. Dacă nu există suficienți embrioni pentru a încărca 15 dintre aceștia într-un incubator, se reduce numărul de incubatoare duplicate până când există suficienți embrioni pentru a încărca 15 dintre aceștia într-un incubator. În plus, în generația F0 ar putea fi adăugate mai multe perechi de reproducere pentru fiecare tratament și martori pentru a produce mai multe icre astfel încât să se ajungă la numărul recomandat de 20 de icre per duplicat.

În ziua de testare 24, perechile de reproducere din F0 sunt eutanasiate și se înregistrează greutatea și lungimea. Dacă este necesar, perechile de reproducere din F0 pot fi păstrate pentru o perioadă suplimentară de 1-2 zile pentru reînceperea F1.

Săptămânile de testare 5-6 (F1)

Cu una până la două zile înainte de data anticipată a începerii eclozării, se oprește sau se reduce agitatea icrelor aflate în faza de incubație pentru a accelera eclozarea. Pe măsură ce embrionii eclozează în fiecare zi, larvele sunt grupate prin intermediul tratamentului și

distribuite în mod sistematic în fiecare bazin cu duplicate larvare în cadrul unui anumit tratament, care conține maxim 12 larve. Acest lucru se realizează prin selectarea aleatorie a larvelor și plasarea unei singure larve în duplicate succesive, în urma unei extrageri nediscriminatorii, trecând în ordine prin duplicatele de tratament specifice până când toate duplicatele din cadrul tratamentului au 12 icre. În cazul în care nu există suficiente larve pentru a umple toate duplicatele, se asigură faptul că există cât mai multe duplicate cu 12 larve pentru a începe faza F1.

Icrele fertilizate care nu au eclozat până în perioada echivalentă cu dublul zilei mediane a incubăției din martor se consideră neviabile și sunt eliminate. Se înregistrează numărul larvelor și se calculează reușita eclozării (capacitatea de eclozare) la fiecare duplicat.

Săptămânile de testare 7-11 (F1)

Se verifică și se înregistrează zilnic supraviețuirea peștilor larvari în toate duplicatele. În ziua de testare 43, se înregistrează numărul de pești supraviețuitori din fiecare duplicat, precum și numărul inițial de larve introduse în duplicat (nominal douăsprezece). Acest lucru permite calcularea ratei de supraviețuire de la eclozare la etapa de subadult.

Săptămânile de testare (F1)

În ziua de testare 78-85, este prelevată o probă mică din înotătoarea caudală a fiecărui pește pentru a determina sexul genotipic al individului (și anume, tăierea înotătoarelor) pentru toți peștii. Aceste informații sunt utilizate pentru a stabili perechi de reproducere.

În termen de trei zile de la determinarea sexului genotipic al fiecărui pește, se stabilesc în mod aleatoriu 12 perechi de reproducere pentru fiecare tratament și 24 de perechi pentru fiecare martor. Se selectează în mod aleatoriu și apoi se grupează după sex doi pești XX și XY din fiecare duplicat, iar apoi dintre aceștia se selectează în mod aleatoriu pești pentru a stabili o pereche de reproducere (de exemplu, perechea XX-XY). Se stabilesc minim 12 replici per tratament chimic și minim 24 de duplicate pentru martor cu o pereche de reproducere pentru fiecare duplicat. În cazul în care un duplicat nu are doi pești XX sau doi pești XY disponibili pentru grupare, atunci ar trebui să se obțină pești cu genotipul de gen adecvat din alte duplicate în cadrul tratamentului.

Restul de pești (maximum 8 pești per duplicat) sunt eutanasiați și supuși prelevării de probe pentru diferite puncte finale ale subadultilor. Datele *dmy* (XX sau XY) pentru toate probele de subadulti sunt reținute pentru a se asigura că toate datele privind punctele finale pot fi asociate cu sexul genetic al fiecărui pește.

Săptămânile de testare 13-14 (F1)

Expunerea continuă pe măsură ce perechile de reproducere subadulte devin adulți. În ziua de testare 98 (și anume, ziua dinaintea începerii colectării icrelor), icrele sunt eliminate atât din acvarii, cât și din femele.

Săptămânile de testare 15-17 (F1)

Icrele eclozate sunt colectate zilnic timp de 21 de zile consecutiv în fiecare duplicat și evaluate pentru fecunditate și fertilitate.

Săptămâna de testare 18 (repetarea săptămânii de testare 4) (F1 și F2)

În ziua de testare 120, se colectează icre din fiecare bazin duplicat dimineața. Icrele colectate sunt evaluate, iar icrele fertilizate (cu filamentele eliminate) de la fiecare pereche de reproducere sunt grupate pe tratamente și distribuite sistematic în camerele de incubare a icrelor, fiind introduse 20 de icre fertilizate în fiecare incubator. Incubatoarele pot fi introduse în „bazine incubatoare” separate constituite pentru fiecare tratament sau în bazinul duplicat care, în momentul eclozării, va conține larvele eclozate. Este preferabil ca embrionii să fie colectați într-o singură zi; însă, dacă nu există suficienți embrioni, embrionii pot fi colectați pe parcursul a două zile. Dacă au fost colectați timp de două zile, toți embrionii din cadrul tratamentelor care au fost colectați în prima zi sunt grupați cu cei colectați în a doua zi. Apoi toți embrionii grupați pentru fiecare tratament sunt distribuiți în mod aleatoriu în fiecare dintre incubatoarele duplicate la 20 de embrioni per incubator. Notă: În cazul în care un singur tratament necesită o a doua zi de colectare, toate tratamentele (inclusiv martorii) trebuie să urmeze această procedură. În cazul în care, după cea de a doua zi de colectare, există un număr insuficient de embrioni în cadrul unui tratament pentru a încărca 20 de embrioni per incubator, se reduce numărul de embrioni încărcați în cadrul respectivului tratamentului specific la 15 embrioni per incubator. Dacă nu există suficienți embrioni pentru a încărca 15 dintre aceștia într-un incubator, se reduce numărul de incubatoare duplicate până când există suficienți embrioni pentru a încărca 15 dintre aceștia într-un incubator.

În ziua de testare 121 (sau ziua de testare 122, pentru a se asigura un bun început pentru F2), perechile de reproducere F1 sunt eutanasiate și analizate pentru punctele finale la adulți. Dacă este necesar, perechile de reproducere din F1 pot fi păstrate pentru o perioadă suplimentară de 1-2 zile pentru reînceperea F2.

Săptămânile de testare 19-20 (F2)

Cu una până la două zile înainte de data anticipată a începerii eclozării, se oprește sau se reduce agitarea icrelor aflate în faza de incubație pentru a accelera eclozarea. În cazul în care testul se încheie prin finalizarea procesului de eclozare la generația F2, larvele sunt numărate și eliminate în fiecare zi. Embrionii care nu au eclozat după un timp de incubație prelungit, definit ca fiind de perioada echivalentă dublului zilei medii de eclozare în martor, sunt considerate neviabile).

Apendicele 10

ANALIZA STATISTICĂ

Tipurile de date biologice generate în cadrul MEOGRT nu sunt unice și, cu excepția datelor privind patologia, au fost elaborate multe metodologii statistice adecvate pentru analiza corespunzătoare a datelor similare în funcție de caracteristicile datelor, inclusiv normalitatea, omogenitatea varianței, dacă proiectul studiului se pretează la testarea ipotezei sau la analiza regresiei, la testele parametrice comparativ cu cele neparametrice etc. Ca și principiu general, analizele statistice sugerate respectă recomandările OCDE pentru datele privind ecotoxicitatea (OCDE 2006), iar în figura 2 se poate observa o diagramă decizională pentru analiza datelor MEOGRT.

Se presupune că, de cele mai multe ori, seturile de date vor afișa răspunsuri monotone. În plus, ar trebui să fie luată în considerare problema utilizării unui test statistic unidirecțional, față de un test statistic bidirecțional. Cu excepția cazului în care există un raționament biologic care ar indica faptul că testul unidirecțional este inadecvat, se recomandă utilizarea testelor unidirecționale. Chiar dacă următoarea secțiune recomandă anumite teste statistice, dacă sunt elaborate metode statistice mai adecvate și/sau mai puternice pentru a fi aplicate în cazul datelor specifice generate în MEOGRT, aceste teste statistice ar fi utilizate pentru a valorifica aceste avantaje.

Datele MEOGRT ar trebui analizate separat pentru fiecare sex genotipic. Există două strategii de analiză a datelor de la peștii cu sex inversat (fie masculi XX, fie femele XY). 1) Se cenzurează toate datele de la peștii cu sexul inversat pe parcursul întregului test, cu excepția prevalenței sexului inversat din fiecare duplicat. 2) Datele de la toți peștii cu sexul inversat sunt lăsate în setul de date și analizate pe baza genotipului.

Date privind histopatologia

Datele privind histopatologia sunt raportate ca punctaje de severitate care sunt evaluate cu ajutorul unei proceduri statistice nou dezvoltate, și anume Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS), (Green *et al.*, 2014). Ajustarea *Rao-Scott* reține informații privind replicarea testului; procedura *by Slices* integrează așteptarea biologică conform căreia punctajele de severitate tind să crească odată cu creșterea concentrațiilor de tratament. Pentru fiecare diagnostic, datele de ieșire RSCABS specifică tratamentele cu o prevalență mai mare a patologiei decât martorii și gradul de severitate aferent.

Date privind fecunditatea

Analizele pentru datele privind fecunditatea constau într-un test de tip „step-down” Jonckheere-Terpstra sau Williams pentru determinarea efectelor tratamentului, cu condiția ca datele să fie consecvente cu o relație concentrație-răspuns monotonă. Cu un test de tip „step-down”, toate comparațiile se realizează la nivelul de semnificație de 0,05 și fără ajustare pentru numărul comparațiilor realizate. Datele sunt prevăzute a fi consecvente cu o relație concentrație-răspuns monotonă, dar acest lucru poate fi verificat fie prin inspecția

vizuală a datelor, fie prin construirea de contraste liniare și pătratice ale mijloacelor de tratare, după o transformare a datelor prin clasificare. Cu excepția cazului în care contrastul pătratic este semnificativ și contrastul liniar nu este semnificativ, se efectuează testul tendinței. În caz contrar, se utilizează testul Dunnett pentru determinarea efectelor tratării dacă datele sunt distribuite în mod normal cu variații omogene. În cazul în care aceste cerințe nu sunt îndeplinite, se utilizează testul Dunn cu o ajustare Bonferroni-Holm. Toate testele indicate sunt efectuate independent de orice test global F- sau Kruskal-Wallis. Mai multe detalii sunt furnizate în OCDE 2006.

Pot fi utilizate metode alternative, cum ar fi un model liniar generalizat cu erori Poisson pentru numărarea icrelor (fără transformare), dacă acestea sunt justificate din punct de vedere statistic (Cameron și Trividi, 2013). Se recomandă un aviz statistic dacă se utilizează o metodă alternativă.

Numărarea zilnică a icrelor în cadrul unei generații unice

Modelul ANOVA este dat de $Y = \text{timp} * \text{timp} + \text{tratament} + * \text{tratament} + \text{timp} * \text{tratament} + * \text{timp} * \text{tratament}$, cu efecte aleatorii ale duplicatului (generare * tratament) și timp * duplicat (tratament), permițând existența unor componente inegale ale varianței pentru ambele tipuri de la o generație la alta. Aici, timpul se referă la frecvența numărării ouălor (de exemplu, zi sau săptămână). Aceasta este o analiză a măsurilor repetate, stabilindu-se corelații între observații cu privire la aceleași duplicate, care reprezintă natura măsurilor repetate a datelor.

Efectele principale ale tratamentului sunt testate folosind testul Dunnett (sau Dunnett-Hsu), care se ajustează în funcție de numărul de comparații. Se impun ajustări pentru efectul principal al generației sau timpului, deoarece, cu acești doi factori, nu există niciun nivel de „control” și fiecare pereche de niveluri reprezintă o comparație a interesului posibil. Pentru aceste două efecte principale, dacă testul F pentru efectul principal este semnificativ la nivelul de 0,05, atunci se pot testa comparații pe perechi între niveluri ale factorului respectiv la nivelul de 0,05 fără ajustări suplimentare.

Modelul include interacțiuni cu două și trei factori, astfel încât, de exemplu, un efect principal, de pildă pentru timp, să nu poată fi semnificativ chiar dacă timpul are un impact semnificativ asupra rezultatelor. Astfel, în cazul în care o interacțiune cu doi sau trei factori care implică timp este semnificativă la nivelul de 0,05, atunci se pot accepta comparațiile nivelurilor de timp la nivelul de semnificație de 0,05, fără o ajustare ulterioară.

Următoarele sunt testele F pentru semnificația tratamentului în intervalul de timp, așa-numitele fragmente din tabelul ANOVA. În cazul în care, fragmentul pentru tratament din F1 și timpul 12 este semnificativ la nivelul de 0,05, atunci comparațiile pe perechi pentru tratament din cadrul F1 și timpul 12 pot fi acceptate fără ajustări ulterioare. Afirmații similare sunt valabile în cazul testelor pentru timp în F1 și tratament, precum și pentru generație într-un interval de timp și tratament.

În cele din urmă, pentru comparații care nu se încadrează în niciuna dintre categoriile de mai sus, comparațiile ar trebui realizate folosind ajustarea Bonferroni-Holm la valorile p.

Informații suplimentare privind analizele unor astfel de modele se găsesc în Hocking (1985) și în Hochberg și Tamhane (1987).

În mod alternativ, datele brute sunt înregistrate și prezentate în raportul privind studiul ca și fecunditate (număr de icre) per duplicat pentru fiecare zi. Ar trebui să se calculeze media duplicată a datelor brute, după care să se aplice transformarea la rădăcină pătrată. Ar trebui să se calculeze ANOVA unidirecțională pe mediile duplicate transformate, apoi contrastele. De asemenea, poate fi util să se inspecteze vizual datele despre fecunditate pentru fiecare tratament și/sau duplicat cu ajutorul unei diagrame cu puncte care afișează date în timp. Acest lucru va permite o evaluare informală a efectelor potențiale în timp.

Toate celelalte date biologice

Analizele statistice se bazează pe ipoteza subiacentă că, printr-o selecție corectă a dozei, datele vor fi monotone. Astfel, se presupune că datele sunt monotone și sunt evaluate în mod formal pentru monotonicitate prin utilizarea unor contraste liniare și pătratice. În cazul în care datele sunt monotone, se recomandă un test Jonckheere-Terpstra asupra tendinței mediilor duplicate (astfel cum a fost recomandat în OCDE 2006). În cazul în care contrastul pătratic este semnificativ și contrastul liniar nu este semnificativ, datele sunt considerate a fi non-monotone.

În cazul în care datele sunt non-monotone, în special din cauza răspunsului redus al celui mai puternic sau al primelor două cele mai puternice tratamente, ar trebui să se aibă în vedere cenzurarea setului de date astfel încât analiza să se facă fără aceste tratamente. Această decizie va trebui luată pe baza raționamentului profesional și a tuturor datelor disponibile, în special a celor care indică toxicitate evidentă la respectivele niveluri de tratament.

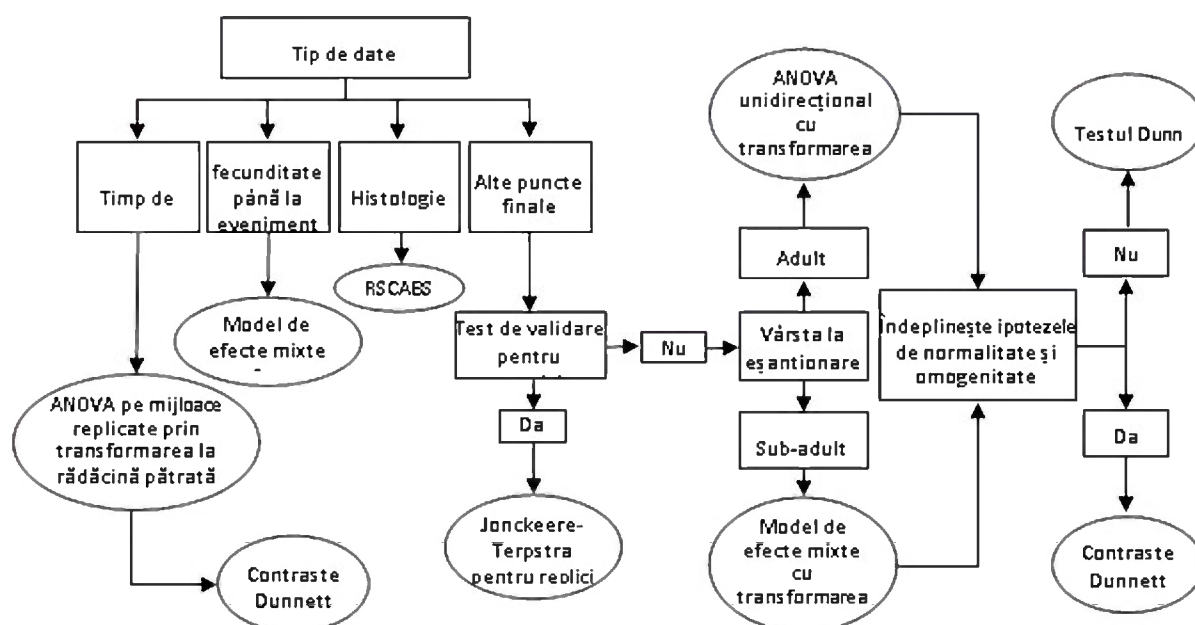
În cazul greutatei și al lungimii, nu se recomandă transformări, deși acestea ar putea fi uneori necesare. Însă se recomandă o transformare la nivelul log în cazul datelor privind vitelogenina; pentru datele SSC se recomandă o transformare la nivelul rădăcinii pătrate (papila înotătoarei anale); se recomandă o transformare a valorii arcsin-rădăcină pătrată pentru datele privind proporția eclozării, procentul de supraviețuire, raportul de gen și procentul icrelor fertile. Timpul pentru eclozare și timpul pentru prima depunere ar trebui să fie considerați drept interval până la datele evenimentelor, iar embrionii individuali neclozați în perioada stabilită sau duplicatele care nu eclozează niciodată sunt tratate drept date cenzurate de drept. Timpul până la eclozare ar trebui să fie calculat din ziua mediană a eclozării la fiecare duplicat. Aceste puncte finale ar trebui să fie analizate cu ajutorul unui model de pericol proporțional Cox cu efecte mixte.

Datele biologice provenite de la probele de adulți prezintă o singură măsurătoare per duplicat, și anume, există un pește XX și un pește XY per acvariu duplicat. Prin urmare, se recomandă efectuarea unui test ANOVA unidirecțional pe mediile duplicate. În cazul în care sunt îndeplinite ipotezele ANOVA (normalitatea și omogenitatea varianței, astfel cum au fost evaluate pe valorile reziduale ale ANOVA prin testul Shapiro-Wilks și, respectiv, Levene), ar trebui să se utilizeze contrastele Dunnett pentru determinarea tratamentelor

diferite de martor. Pe de altă parte, dacă ipotezele ANOVA nu sunt îndeplinite, atunci ar trebui să se efectueze un test Dunn pentru a stabili tratamentele care au fost diferite de martor. Se recomandă o procedură similară pentru datele care sunt prezentate sub formă de procente (fertilitate, eclozare și supraviețuire).

Datele biologice obținute din probele subadulte prezintă între 1 și 8 măsurători per duplicat, și anume, pot exista numere variabile de indivizi care contribuie la media duplicatului pentru fiecare sex genotipic. Prin urmare, se recomandă utilizarea unui model ANOVA cu efecte mixte și apoi a contrastelor Dunnett în cazul în care au fost adevărate ipotezele de normalitate și de omogenitate a varianței (pe valorile reziduale ale efectelor mixte ANOVA). Dacă acestea nu s-au adevărat, ar trebui să fie efectuat un test Dunn pentru a stabili tratamentele care au fost diferite de martor.

Figura 2: Diagramă pentru procedurile statistice recomandate pentru analiza datelor MEOGRT.



Referințe bibliografice

- (1) OCDE (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.
- (2) Cameron AC și Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

- (3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.
- (4) Hochberg Y și Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

C.53 TESTUL PRIVIND CREȘTEREA ȘI DEZVOLTAREA LARVELOR DE AMFIBIENI (LAGDA)

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea nr. 241 (2015). Necesitatea de a dezvolta și de a valida un test care poate să identifice și să caracterizeze consecințele adverse ale expunerii la substanțe chimice toxice la amfibieni apare ca urmare a preocupărilor privind faptul că nivelurile substanțelor chimice din mediu pot cauza efecte adverse atât la oameni, cât și la animale. Orientarea OCDE privind testarea din Testul cu privire la creșterea și dezvoltarea larvelor de amfibieni (LAGDA) descrie un test de toxicitate la o specie de amfibieni, care analizează creșterea și dezvoltarea, de la fertilizare la începutul perioadei juvenile. Este un test (de regulă, 16 săptămâni) care evaluează dezvoltarea timpurie, metamorfoza, supraviețuirea, creșterea și maturizarea parțială a sistemului de reproducere. Aceasta permite, de asemenea, măsurarea unei serii de alte puncte finale, care permite evaluarea prin diagnosticare a substanțelor chimice suspectate de a perturba sistemul endocrin (EDC) sau a altor tipuri de substanțe toxice pentru dezvoltare și reproducere. Metoda descrisă în această metodă de testare constituie rezultatul activității de validare cu privire la broasca africană cu gheare (*Xenopus laevis*), care a fost desfășurată de Agenția SUA pentru protecția mediului (U.S. EPA), și al activității de sprijin desfășurate în Japonia (1). Deși alte specii de amfibieni pot fi adaptate la un protocol de testare pentru creștere și dezvoltare, capacitatea de a determina sexul genetic constituind o componentă importantă, metodele specifice și punctele finale de observație detaliate în prezenta metodă de testare sunt aplicabile numai în cazul *Xenopus laevis*.
2. LAGDA servește drept test de nivel superior asupra unui amfibian pentru colectarea de informații mai cuprinzătoare despre concentrație-răspuns cu privire la efectele adverse adecvate pentru a fi utilizate în identificarea și caracterizarea pericolelor, precum și în evaluarea riscurilor ecologice. Testul se încadrează la nivelul 4 din Cadrul conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea substanțelor chimice care perturbă procesele endocrine, în cazul în care testele *in vivo* furnizează, de asemenea, date privind efectele adverse asupra punctelor finale relevante pentru sistemul endocrin (2). Modelul experimental general implică expunerea embrionilor *X. laevis* din etapele 8-10 din Nieuwkoop și Faber (NF) (3) la cel puțin patru concentrații diferite din substanța chimică de testat (în general, stabilite cel puțin la intervale demi-logaritmice) și martor(i) până la împlinirea a 10 săptămâni după timpul median în etapa 62 din NF în martor, cu o probă secundară intermediară în etapa 62 din NF [≤ 45 după fertilizare; de regulă, în jurul a 45 de zile (zdf)]. În fiecare concentrație de testare există patru duplicate cu opt duplicate pentru

martor. Punctele finale evaluate în timpul expunerii (la proba secundară intermediară și la proba finală la încheierea testului) includ respectivii indicatori ai toxicității generalizate: mortalitate, comportament anormal și determinări de creștere (lungime și greutate), precum și puncte finale concepute pentru caracterizarea unor moduri de acțiune specifice ale toxicității endocrine care vizează procesele fiziologice mediate de estrogen, androgen sau tiroidă. Metoda acordă atenție, în primul rând, efectelor potențiale relevante asupra populației (și anume, efectele adverse asupra supraviețuirii, dezvoltării, creșterii și dezvoltării reproductive) pentru calcularea unei concentrații la care nu se observă niciun efect (NOEC) sau a unei concentrații efective care provoacă o modificare x % (CE_x) a punctului final măsurat. Deși ar trebui remarcat faptul că abordările CE_x sunt rareori adecvate pentru astfel de studii ample, unde creșterea numărului de concentrații de testare pentru a permite determinarea CE_x dorită ar putea să nu fie practică. De asemenea, ar trebui remarcat faptul că metoda nu acoperă faza de reproducere în sine. Definițiile utilizate în cadrul acestei metode de testare sunt prezentate în apendicele 1.

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

3. Din cauza numărului limitat de substanțe chimice testate și al laboratoarelor implicate în procesul de validare a acestui test destul de complex, în special reproductibilitatea între laboratoare nu este documentată cu date experimentale până la această dată, se prevede că, atunci când un număr suficient de studii sunt disponibile pentru a confirma impactul acestui nou model de studiu, orientarea 241 a OCDE privind testarea va fi analizată și, dacă este necesar, va fi revizuită în contextul experienței dobândite. LAGDA este un test important pentru a aborda potențiali factori care contribuie la declinul populației de amfibieni prin evaluarea efectelor expunerii la substanțele chimice în etapa larvară sensibilă, în care efectele asupra supraviețuirii și a dezvoltării, inclusiv a dezvoltării normale a organelor de reproducere, pot afecta negativ populațiile.
4. Testul este conceput pentru a detecta (un) efect(e) apical(e) ca urmare a mecanismelor endocrine și neendocrine și include puncte finale de diagnosticare care sunt parțial specifice principalelor modalități endocrine. Ar trebui remarcat faptul că până la elaborarea LAGDA nu a existat un test validat care să servească acestei funcții pentru amfibieni.
5. Înainte de începerea testului, este important să existe informații cu privire la proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice de testat, în special pentru a permite adoptarea de soluții chimice stabile. De asemenea, este necesar să existe o metodă analitică suficient de sensibilă pentru verificarea concentrațiilor substanțelor chimice de testat. Pe o durată de aproximativ 16 săptămâni, testul necesită un număr total de 480 de animale, și anume embrioni *X. laevis* (sau 640 de embrioni, în cazul în care se utilizează un martor solvent),

pentru a asigura o putere suficientă a testului în vederea evaluării punctelor finale relevante precum creșterea, dezvoltarea și maturizarea sistemului de reproducere.

6. Înainte de utilizarea metodei de testare pentru testarea unui amestec în scopul reglementării, trebuie luat în considerare dacă aceasta va oferi rezultate acceptabile pentru procesul de reglementare prevăzut. În plus, această testare nu evaluează fecunditatea în mod direct, astfel încât aceasta nu poate fi aplicabilă pentru a fi utilizată într-un stadiu mai avansat decât nivelul 4 din Cadrul conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea substanțelor chimice care perturbă procesele endocrine.

BAZA ȘTIINȚIFICĂ PENTRU METODA DE TESTARE

7. O mare parte din înțelegerea noastră actuală privind biologia amfibienilor a fost dobândită utilizând specia model de laborator *X. laevis*. Această specie poate fi cultivată în mod curent în laborator, ovulația poate fi indusă prin utilizarea gonadotropinei corionice umane (hCG), iar stocurile de animale sunt imediat disponibile la crescătorii de animale din comerț.
8. La fel ca la toate vertebratele, reproducerea la amfibieni este sub controlul axei gonadale pituitare hipotalamice (HPG) (4). Estrogenii și androgenii sunt mediatori ai acestui sistem endocrin, ghidând dezvoltarea și fiziologia țesuturilor dimorfice sexual. Există trei faze distincte în ciclul de viață al amfibienilor, când această axă este deosebit de activă: (1) o diferențiere gonadală în timpul dezvoltării larvelor, (2) dezvoltarea caracteristicilor sexuale secundare și maturizarea gonadală în faza juvenilă și (3) reproducerea funcțională a adulților. Fiecare dintre aceste trei ferestre de dezvoltare este susceptibilă de perturbare endocrină din cauza anumitor substanțe chimice precum estrogenii și androgenii, conducând în cele din urmă la o pierdere a capacității de reproducere a organismelor.
9. Gonadele încep să se dezvolte în etapa 43 din NF, atunci când se dezvoltă pentru prima dată creasta gonadală bipotențială. Diferențierea gonadelor începe în etapa 52 din NF, atunci când celulele germinale primare fie migrează spre țesutul tisular medular (masculi), fie rămân în regiunea corticală (femele) a gonadelor aflate în dezvoltare (3). Acest proces de diferențiere sexuală a gonadelor a fost raportată prima dată ca fiind susceptibil de a fi modificat chimic la *Xenopus* în anii 1950 (5) (6). Expunerea mormolocilor la estradiol în această perioadă de diferențiere a gonadelor duce la inversarea sexului la masculi care, atunci când ajung la vârsta adultă, sunt femele complet funcționale (7) (8). Inversarea funcțională a sexului femelelor în cel al masculilor este, de asemenea, posibilă și a fost raportată în urma implantării de țesut testicular la mormoloci (9). Însă, deși expunerea la un inhibitor al aromatazei cauzează, de asemenea, inversarea funcțională a sexului la *X. tropicalis* (10), nu s-a demonstrat că aceasta apare la *X. laevis*. Din punct de vedere istoric, efectele substanțelor toxice asupra diferențierii gonadelor au fost evaluate prin examinarea

histologică a gonadelor la metamorfoză, iar inversarea sexelor a putut fi determinată doar prin analizarea ratelor sexuale. Până de curând, nu a existat niciun mijloc de determinare directă a sexului genetic la *Xenopus*. Însă, o stabilire recentă a markerilor legați de sex la *X. laevis* permite determinarea sexului genetic și permite identificarea directă a animalelor cu sexul inversat (11).

10. La masculi, dezvoltarea juvenilă apare atunci când cresc nivelurile de testosteron din sânge, ceea ce corespunde dezvoltării caracteristicilor sexuale secundare, precum și dezvoltării testiculelor. La femele, estradiolul este produs de ovare, ducând la apariția vitelogeninei (VTG) în plasmă și a ovocitelor vitelogenice în ovar, precum și la dezvoltarea oviductelor (12). Oviductele reprezintă caracteristici sexuale secundare la femele, care funcționează în etapa de maturare a ovocitelor în timpul reproducerii. Ovocitele sunt acoperite cu un strat gelatinos atunci când trec prin oviduct și se colectează în ovisac, gata de fertilizare. Dezvoltarea oviductului pare a fi reglată de estrogeni întrucât dezvoltarea este corelată cu nivelurile de estradiol din sânge la *X. laevis* (13) și *X. tropicalis* (12). S-a raportat dezvoltarea oviductului la masculi în urma expunerii la compușii bifenili policlorurați (14) și 4-*terț*-octilfenol (15).

PRINCIPIUL TESTULUI

11. Modelul experimental implică expunerea embrionilor *X. laevis* din etapele 8-10 din NF, pe calea apei, la cel puțin patru concentrații diferite din substanța chimică de testat și martor(i) până la împlinirea a 10 săptămâni după timpul median în etapa 62 din NF în martor, cu o probă secundară intermediară în etapa 62 din NF. Deși poate fi posibilă, de asemenea, dozarea de substanțe chimice foarte hidrofobe prin intermediul hranei, există o experiență redusă în utilizarea acestei căi de expunere în acest test până în prezent. În fiecare concentrație de testare există patru duplicate cu opt duplicate pentru fiecare martor utilizat. Punctele finale evaluate în cursul expunerii le includ pe cele care indică toxicitatea generalizată [și anume, mortalitatea, comportamentul anormal și determinările privind creșterea (lungime și greutate)], precum și punctele finale prevăzute a caracteriza modurile de acțiune ale toxicității endocrine care vizează procesele fiziologice mediate de estrogen, androgen sau tiroidă (și anume, histopatologia tiroidiană, histopatologia gonadei și a canalului gonadal, dezvoltarea anormală, vitelogenina din plasmă (opțional) și raportul sexului genotipic/fenotipic).

CRITERIILE DE VALIDITATE A TESTULUI

12. Se aplică următoarele criterii de valabilitate a testului:

- concentrația oxigenului dizolvat ar trebui să fie, pe parcursul testării, $\geq 40\%$ din valoarea saturației aerului;
 - temperatura apei ar trebui să fie în intervalul de 21 ± 1 °C, iar diferențele între duplicate și diferențele între tratamente nu ar trebui să depășească 1,0 °C;
 - pH-ul soluției de testat ar trebui să fie menținută între 6,5 și 8,5, iar diferențele între duplicate și diferențele între tratamente nu ar trebui să depășească 0,5;
 - ar trebui să existe dovezi care să demonstreze menținerea satisfăcătoare a concentrațiilor substanței utilizate în test în intervalul de ± 20 % din valorile medii măsurate;
 - mortalitatea în perioada de expunere ar trebui să fie ≤ 20 % în fiecare duplicat în martori;
 - viabilitate de ≥ 70 % la icrele alese pentru a începe studiul;
 - timpul median până la etapa 62 din NF al martorilor ar trebui să fie de ≤ 45 de zile.
 - Greutatea medie a organismelor de testat în etapa 62 din NF și la încheierea testului la martori și martori tratați cu solvent (dacă se utilizează) ar trebui să atingă $1,0 \pm 0,2$ și, respectiv, $11,5 \pm 3$ g.
13. Deși nu este un criteriu de validitate, se recomandă ca cel puțin trei niveluri de tratament cu trei duplicate necompromise să fie disponibile pentru analiză. Mortalitatea excesivă, care compromite un tratament, este definită ca > 4 mortalități (> 20 %) la 2 sau mai multe duplicate care nu pot fi explicate prin eroare tehnică. Cel puțin trei niveluri de tratament fără toxicitate evidentă ar trebui să fie disponibile pentru analiză. Semnele de toxicitate evidentă pot include, printre altele, plutirea la suprafață, stagnarea pe fundul rezervorului, înotare inversă sau neregulată, lipsa activității la apariție la suprafață și lipsa de reacție la stimuli, anomalii morfologice (de exemplu, diformități ale membrelor), leziuni hemoragice și un edem abdominal.
14. În cazul în care se observă o abatere de la criteriile de validitate a testului, consecințele ar trebui să fie luate în considerare în raport cu fiabilitatea rezultatelor testului, iar aceste abateri și considerații ar trebui să fie incluse în raportul testului.

DESCRIEREA METODELOR

Aparatură

15. Echipamentul obișnuit de laborator și, în special, următoarele:
- (a) aparatură de control al temperaturii (de exemplu, aparate de încălzire sau aparate de răcire ajustabile la $22^\circ \pm 1$ °C);
 - (b) termometru;
 - (c) un microscop binocular pentru disecție și instrumente de disecție;

- (d) cameră digitală cu o rezoluție de cel puțin 4 megapixeli și cu funcție micro (dacă este necesar);
- (e) balanță analitică având o capacitate de măsurare până la 0,001 mg sau 1 μg ;
- (f) aparat de măsurare a oxigenului dizolvat și a pH-ului;
- (g) aparat de măsurare a intensității luminii care poate măsura în lucrși.

Apă

Sursă și calitate

16. Poate fi folosită orice apă de diluție care este disponibilă la nivel local (de exemplu, apa de izvor sau apa de la robinet filtrată prin filtru de cărbune) și care permite creșterea și dezvoltarea normală a *X. laevis* și ar trebui să existe dovezi privind creșterea normală în această apă. Întrucât calitatea apei locale poate varia în mod semnificativ de la o zonă la alta, ar trebui efectuată o analiză a calității apei, în special dacă nu sunt disponibile date istorice privind utilitatea respectivei ape pentru creșterea larvelor de amfibieni. În cazul în care se cunoaște calitatea relativ constantă a apei de diluție, ar trebui să se măsoare, înainte de începerea testului și/sau, spre exemplu, la șase luni, 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-}), pesticide, carbon organic total și materii solide în suspensie. Unele caracteristici chimice ale unei ape de diluție acceptabile sunt prezentate în apendicele 2.

Concentrația de iodid din apa de testare

17. Pentru ca glanda tiroidă să sintetizeze hormoni tiroidieni pentru a susține metamorfoza normală, ar trebui să existe o cantitate suficientă de iodid pentru larve printr-o combinație de surse apoase și alimentare. În prezent, nu există orientări stabilite în mod empiric pentru concentrații de iodid minime în alimente sau în apă pentru a asigura dezvoltarea corespunzătoare. Cu toate acestea, cantitățile de iodid disponibile pot afecta reactivitatea sistemului tiroidian la agenții activi asupra tiroidei, un factor de altfel cunoscut ca influențând activitatea bazală a glandei tiroide, ceea ce trebuie luat în considerare în momentul interpretării rezultatelor histopatologiei tiroidei. Pe baza unor lucrări anterioare, efectuarea cu succes a testului este demonstrată atunci când concentrațiile de iodid (I^-) din apa de diluție variază între 0,5 și 10 $\mu\text{g/l}$. În mod ideal, concentrația minimă de iodid din apa de diluție pe parcursul testului ar trebui să fie de 0,5 $\mu\text{g/l}$ (adăugată sub formă de clorură de sodiu sau de potasiu). Dacă apa pentru testare este reconstituită din apă deionizată, ar trebui să se adauge iod într-o concentrație minimă de 0,5 $\mu\text{g/l}$. Ar trebui să se raporteze concentrațiile de iodid măsurate din apa de testare (și anume, apa de diluție) și suplimentarea apei de testare cu iod sau cu alte săruri (dacă se utilizează). Conținutul de iod poate fi măsurat, de asemenea, în aliment(e), în plus față de apa de testare.

Sistemul de expunere

18. Testul a fost dezvoltat cu ajutorul unui sistem de diluare în regim dinamic. Componentele sistemului ar trebui să aibă componente care intră în contact cu apa confecționate din sticlă, oțel inoxidabil și/sau alt material inert din punct de vedere chimic. Bazinele de expunere ar trebui să fie acvarii din sticlă sau oțel inoxidabil, iar volumul utilizabil al acestora ar trebui să fie între 4,0 și 10,0 l (adâncimea minimă a apei de 10-15 cm). Sistemul ar trebui să poată susține toate concentrațiile de expunere, un martor și un martor tratat cu solvent, dacă este necesar, cu patru duplicate per tratament și opt în martori. Debitul fiecărui bazin ar trebui să fie constant, ținându-se cont atât de menținerea condițiilor biologice, cât și de expunerea la substanța chimică. Se recomandă ca debitele să fie adecvate (de exemplu, cel puțin 5 înlocuiri pe zi) pentru a evita scăderea concentrației chimice din cauza metabolismului atât a organismelor de testare, cât și a microorganismelor acvatiche prezente în acvariile, sau căile abiotice de degradare (hidroliză, fotoliză) sau disipare (volatilizare, sorbție). Bazinele de tratament ar trebui să fie distribuite în mod aleatoriu într-o poziție în cadrul sistemului de expunere pentru a reduce eventualele efecte de poziție, inclusiv variațiile ușoare ale temperaturii, intensității luminii etc.). Informații suplimentare privind instalarea sistemelor de expunere în regim dinamic pot fi obținute prin intermediul Ghidului standard ASTM pentru efectuarea testelor de toxicitate acută pe materiale de testare cu specii de pești, macronevertebrate și amfibieni (16).

Livrarea substanței chimice: pregătirea soluțiilor de testat

19. Pentru a prepara soluțiile de testat în sistemul de expunere, soluția mamă a substanței chimice de testat ar trebui să fie dozată în sistemul de expunere prin intermediul unei pompe adecvate sau al unui alt aparat. Debitul soluției mamă ar trebui să fie calibrat în conformitate cu confirmarea analitică a soluțiilor de testat înainte de începerea expunerii și verificat din punct de vedere volumetric în mod regulat, pe durata testului. Soluția de testat din fiecare cameră ar trebui reînnoită ca volum de cel puțin 5 ori pe zi.
20. Metoda utilizată pentru a introduce substanța chimică de testat în sistem poate varia în funcție de proprietățile sale fizico-chimice. Prin urmare, înainte de test, ar trebui să se obțină informații de referință cu privire la substanța chimică, ce sunt relevantă pentru determinarea capacității de testare a acesteia. Informații utile cu privire la proprietățile specifice substanței chimice de testat includ formula structurală, greutatea moleculară, puritatea, stabilitatea în apă și la lumină, pK_a și K_{ow} , solubilitatea în apă (de preferință în mediul de testare) și presiunea vaporilor, precum și rezultatele unui test efectuat pentru biodegradabilitate rapidă [metoda de testare C.4 (17) sau C.29 (18)]. Solubilitatea și presiunea vaporilor pot fi folosite pentru a calcula constanta legii lui Henry, care va arăta dacă pot să se producă pierderi din cauza evaporării substanței chimice de testat.

Efectuarea acestui test fără informațiile enumerate mai sus ar trebui să fie analizată cu atenție, deoarece proiectul studiului va depinde de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice de testat și, fără aceste date, rezultatele testelor ar putea fi dificil de interpretat sau inutile. Ar trebui să fie disponibilă o metodă analitică fiabilă de cuantificare a substanței chimice de testat în soluțiile de testare, cu precizia și limita de detecție cunoscute și raportate. Substanțele chimice solubile în apă pot fi dizolvate în alicote de apă de diluție la o concentrație care permite livrarea la concentrația de testare vizată în cadrul unui sistem în regim dinamic. Substanțele chimice lichide sau solide la temperatura camerei și moderat solubile în apă pot necesita saturatori lichid:lichid sau lichid:solid (de exemplu, coloană din vată de sticlă) (19). Deși poate fi posibilă, de asemenea, dozarea de substanțe chimice foarte hidrofobe prin intermediul hranei, există o experiență redusă în utilizarea respectivei căi de expunere în acest test.

21. Soluțiile de testat din concentrațiile alese se prepară prin diluarea unei soluții mamă. Soluția mamă ar trebui să se prepare, de preferință, prin simpla amestecare sau agitare a substanței chimice de testat în apa de diluție prin mijloace mecanice (de exemplu, amestecarea sau ultrasonificarea). Pentru obținerea unei soluții mamă cu o concentrație corespunzătoare se pot folosi coloane/sisteme de saturare sau metode de dozare pasivă (20). Se preferă utilizarea unui sistem de testare fără co-solvenți; însă substanțe chimice de testat diferite vor avea proprietăți fizico-chimice variate care vor necesita probabil abordări diferite pentru prepararea apei de expunere la o substanță chimică. Ar trebui să se depună toate eforturile pentru evitarea solvenților sau a purtătorilor deoarece: (1) anumiți solvenți pot avea ca rezultat toxicitatea și/sau răspunsuri nedorite sau neașteptate, (2) testarea substanțelor chimice peste solubilitatea lor în apă (astfel cum se poate întâmpla frecvent prin utilizarea solvenților) poate duce la determinări inexacte ale concentrațiilor efective, (3) utilizarea solvenților în teste pe termen mai lung poate conduce la un grad semnificativ de „biofilmare” asociat cu activitatea microbiană, ceea ce ar putea avea un impact asupra condițiilor de mediu și a capacității de a menține concentrațiile de expunere și (4) în absența unor date istorice care să demonstreze că solventul nu influențează rezultatul studiului, utilizarea solvenților necesită un tratament al martorului tratat cu solvent care are implicații semnificative asupra bunăstării animalelor, întrucât sunt necesare animale suplimentare pentru efectuarea testului. În ceea ce privește substanțele chimice care sunt dificil de testat, ar putea fi utilizat, în ultimă instanță, un solvent și ar trebui să se consulte documentul de orientare al OCDE privind testarea toxicității acvatică a substanțelor și amestecurilor dificile (21) pentru a determina cea mai bună metodă. Alegerea solventului va fi determinată de proprietățile chimice ale substanței chimice de testat și de disponibilitatea datelor istorice despre martor cu privire la solvent. În absența datelor istorice, caracterul adecvat al unui solvent ar trebui determinat înainte de efectuarea studiului definitiv. În cazul în care utilizarea unui solvent este inevitabilă și se produce activitatea microbiană (bio-filmare), se recomandă înregistrarea/raportarea bio-filmării pe

rezervor (cel puțin săptămânal) pe durata testului. În mod ideal, concentrația solventului ar trebui să fie menținută constantă în martorul solvent și în toate tratamentele pentru testare. În cazul în care concentrația solventului nu este menținută constantă, în martorul solvent ar trebui utilizată cea mai mare concentrație în cadrul tratamentului pentru testare. În cazurile în care se utilizează solvent purtător, concentrațiile maxime ale solventilor nu ar trebui să depășească 100 µl/l sau 100 mg/l (21) și se recomandă să se mențină concentrația solventului la un nivel cât mai scăzut posibil (de exemplu, ≤ 20 µl/l) pentru a evita eventualele efecte ale solventului asupra punctelor finale măsurate (22).

Animalele de testare

Specia de testare

22. Specia de testare este *X. laevis*, deoarece aceasta este: (1) cultivată, de regulă, în laboratoare din întreaga lume, (2) ușor de obținut prin intermediul furnizorilor comerciali și (3) prezintă posibilitatea de a determina sexul genetic.

Îngrijirea și reproducerea exemplarelor adulte

23. Îngrijirea și reproducerea adecvată a *X. laevis* sunt descrise într-o orientare standardizată (23). Adăpostirea și îngrijirea *X. laevis* sunt descrise, de asemenea, de către Read (24). Pentru a induce reproducția, se injectează intraperitoneal între trei și cinci perechi de femele și masculi adulți cu gonadotropină corionică umană (hCG). Exemplarele femele și masculi, sunt injectate cu, de exemplu, aproximativ 800-1 000 UI și, respectiv, 500-800 UI de hCG dizolvată în soluție salină de 0,6-0,9 % (sau în soluția lui Ringer pentru broaște, o soluție salină izotonică pentru utilizare la amfibieni; www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html). Volumul de injecție ar trebui să fie de aproximativ 10 µl/g greutate corporală (~ 1 000 µl). Ulterior, cuplurile reproducătoare induse sunt ținute în bazine de mari dimensiuni, ferite de perturbări și în condiții statice pentru promovarea amplexusului. Fundul fiecărui bazin de reproducere ar trebui să fie prevăzut cu un fund fals din plasă din oțel inoxidabil (de exemplu, cu orificii de 1,25 cm), care să permită căderea icrelor pe fundul bazinului. Broaștele injectate cu hCG după-amiaza târziu vor depune, de regulă, cea mai mare parte a icrelor până la jumătatea dimineții zilei următoare. După ce se eliberează și se fertilizează o cantitate suficientă de icre, adulții ar trebui să fie îndepărtați din bazinele de reproducere. Icrele sunt apoi colectate și straturile gelatinoase sunt eliminate prin tratare cu L-cisteină (23). Ar trebui să se prepare o soluție de 2 % L-cisteină, iar pH-ul ar trebui să fie ajustat la 8,1 cu NaOH de 1 M. Această soluție de 21 °C se adaugă într-un vas Erlenmeyer de 500 ml care conține icrele de la o singură depunere și se rotește ușor timp de unu sau două minute, iar apoi se clătește bine de 6-8 ori cu apă de cultură la 21 °C. Icrele sunt apoi transferate într-un vas de cristalizare și se stabilește viabilitatea de > 70 %, cu anomalii minime la nivelul embrionilor care prezintă diviziunea celulară.

TIPUL TESTULUI

Concentrații de testare

24. Se recomandă utilizarea a minimum patru concentrații chimice și martori adecvați (inclusiv martori cu solvent, dacă este necesar). În general, se recomandă o separare a concentrației (factor de spațiere) de cel mult 3,2.
25. În scopul acestui test, rezultatele studiilor existente asupra amfibienilor ar trebui utilizate, în măsura în care este posibil, la determinarea celei mai mari concentrații de testare, astfel încât să se evite concentrațiile în mod evident toxice. Informațiile, spre exemplu, din relații cantitative structură-activitate, citirile încrucișate și datele provenite de la studiile existente pe amfibieni, cum ar fi testul metamorfozei la amfibieni, metoda de testare C.38 (25) și testul teratogenezei la embrionii de broască - *Xenopus* (23) și/sau testele efectuate asupra peștilor, cum ar fi metodele de testare C.48, C.41 și C.49 (26) (27) (28), pot contribui la stabilirea acestei concentrații. Înainte de a derula testul LADDA, se poate realiza un experiment pentru stabilirea intervalului. Se recomandă ca expunerea pentru stabilirea intervalului să fie inițiată în termen de 24 de ore de la fertilizare și să fie continuată timp de 7-14 zile (sau mai mult, dacă este necesar), iar concentrațiile de testare să fie stabilite astfel încât intervalele dintre concentrațiile de testare să nu fie mai mari decât un factor de 10. Rezultatele obținute în urma experimentului de stabilire a intervalului ar trebui să servească la stabilirea celei mai mari concentrații de testare în cadrul LAGDA. Este de precizat că, în cazul în care trebuie să fie utilizat un solvent, ar putea fi stabilit caracterul adecvat al a solventului (și anume, dacă acesta poate avea un impact asupra rezultatului studiului) în cadrul studiului de stabilire a intervalului.

Duplicate în cadrul grupurilor de tratament și al martorilor

26. Ar trebui să se utilizeze cel puțin patru bazine duplicate pentru fiecare concentrație de testare și cel puțin opt duplicate pentru martori (și, martor cu solvent, dacă este necesar) (de exemplu, numărul de duplicate din martor și orice martor cu solvent ar trebui să fie de două ori mai mare decât numărul de duplicate din fiecare grup supus tratamentului, pentru a se asigura o putere statistică adecvată). Fiecare duplicat ar trebui să conțină cel mult 20 de animale. Numărul minim de animale prelucrate ar fi 15 (5 pentru subeșantioanele din etapa 62 din NF și 10 exemplare juvenile). Însă, se adaugă animale suplimentare în fiecare duplicat pentru a se lua în calcul posibilitatea mortalității, menținându-se în același timp un număr critic de 15.

PROCEDURA

Prezentarea testului

27. Testul este inițiat cu embrioni nou eclozați (etapele 8-10 din NF) și poate continua până la dezvoltarea juvenilă. Animalele sunt examinate zilnic pentru identificarea mortalității și a oricăror semne de comportament anormal. În etapa 62 din NF, se colectează un subeșantion de larve (până la 5 animale per duplicat) și se examinează diferite puncte finale (tabelul 1). După ce toate animalele au ajuns în etapa 66 din NF, și anume, la încheierea metamorfozei (sau după 70 de zile de la inițierea testului, oricare dintre acestea survine mai întâi), se procedează în mod aleatoriu la sacrificare (dar fără subeșantionare) pentru a reduce numărul de animale (10 pe bazin) (a se vedea punctul 43), iar animalele rămase sunt în continuare expuse până la împlinirea a 10 săptămâni de la timpul median în etapa 62 din NF din martor. La încheierea testului (eșantionarea juvenilă), se efectuează măsurători suplimentare (tabelul 1).

Condiții de expunere

28. Apendicele 3 cuprinde o prezentare completă a parametrilor de testare. În perioada de expunere ar trebui măsurate zilnic oxigen dizolvat, temperatura și pH-ul soluțiilor de testare. Conductivitatea, alcalinitatea și duritatea se măsoară o dată pe lună. În cazul temperaturii apei din soluția de testat, diferențele între duplicate și tratamente (într-o singură zi) nu ar trebui să depășească 1,0 °C. De asemenea, în cazul pH-ului soluțiilor de testare, diferențele între duplicate și tratamente nu ar trebui să fie mai mari de 0,5.
29. Bazinele de expunere pot fi sifonate zilnic pentru a îndepărta alimentele neconsumate și deșeurile, astfel încât să se evite contaminarea încrucișată a bazinelor. Ar trebui să se acorde atenție reducerii la minim a stresului și traumei la animale, în special în timpul deplasării, al curățării acvariului și al manipulării. Condițiile/activitățile stresante, precum zgomotul puternic și/sau neîncetat, lovirea acvariilor, vibrațiile în bazin, ar trebui evitate.

Durata expunerii la substanța chimică de testat

30. Expunerea este inițiată la embrionii nou eclozați (etapele 8-10 din NF) și se continuă până la împlinirea a zece săptămâni după timpul median în etapa 62 din NF (≤ 45 de zile de la inițierea testului) în grupul martor. În general, durata LAGDA este de 16 săptămâni (maximum 17 săptămâni).

Inițierea testului

31. Pentru animalele părinți utilizate pentru inițierea testului ar fi trebuit să se dovedească anterior că se poate determina sexul genetic al progeniturilor lor (apendicele 5). După ce adulții au depus icre, embrionii sunt colectați, tratați cu cisteină pentru a elimina stratul de gelatină și verificați pentru viabilitate (23). Tratamentul cu cisteină permite manipularea embrionilor în timpul verificării fără lipirea de suprafețe. Verificarea are loc sub un microscop de disecție, utilizând o pipetă oculară de dimensiuni corespunzătoare pentru a elimina embrionii neviabili. Se preferă ca, pentru test, să se utilizeze icrele din cadrul unei

singure depuneri care determină o viabilitate de peste 70 %. Embrionii din etapele 8-10 din NF sunt distribuiți în mod aleatoriu în bazine de tratare prin expunere care conțin un volum adecvat de apă de diluție până când fiecare bazin conține 20 de embrioni. Embrionii ar trebui să fie manipulați cu grijă pe durata acestui transfer pentru a reduce la minim stresul cauzat de manipulare și pentru a evita orice vătămare. La 96 ore după fertilizare, mormolocii ar trebui să se deplaseze spre partea superioară a coloanei de apă și să înceapă să se prindă de părțile laterale ale bazinului.

Regimul de hrănire

32. Modificarea ratei hranei și a ratei de alimentare în diferite etape ale vieții *X. laevis* constituie un aspect foarte important al protocolului LAGDA. Hrănirea excesivă a larvelor în etapa larvară conduce, de regulă, la o creștere a incidenței și gravității scoliozei (apendicele 8) și ar trebui evitată. Pe de altă parte, hrănirea necorespunzătoare în faza larvară conduce la rate de dezvoltare foarte variabile între martori, ceea ce poate să compromită puterea statistică sau să creeze confuzie la nivelul rezultatelor testului. Apendicele 4 prezintă regimul alimentar și de hrănire recomandat pentru larve și exemplarele juvenile pentru *X. laevis* în condiții dinamice, dar sunt permise alternative cu condiția ca organismele supuse testării să crească și să se dezvolte în mod satisfăcător. Este important de remarcat că, în cazul în care se măsoară punctele finale specifice sistemului endocrin, hrana ar trebui să nu conțină substanțe active endocrin, precum făina de soia.

Hrănirea larvelor

33. Hrana larvară recomandată constă în furaje de început pentru păstrăvi, discuri de alge *Spirulina* și chipsuri de alge (de exemplu, fulgi TetraFin®, Tetra, Germania) amestecați în apă de cultură (sau diluție). Acest amestec se administrează de trei ori pe zi în zilele lucrătoare și o dată pe zi în weekend. Mormolocii sunt hrăniți, de asemenea, cu creveți în saramură *Artemia* spp., cu nauplii de 24 de ore, de două ori pe zi în timpul săptămânii și o dată pe zi în weekend, începând cu ziua 8 după fertilizare. Hrana larvară, care ar trebui să fie consecventă în fiecare vas de testare, ar trebui să permită creșterea și dezvoltarea corespunzătoare a animalelor de testare, pentru a asigura reproductibilitatea și transferabilitatea rezultatelor testului: (1) timpul median până la etapa 62 din NF la martori ar trebui să fie ≤ 45 de zile și (2) se recomandă o masă medie cuprinsă între $1,0 \pm 0,2$ g în etapa 62 din NF la martori.

Hrana puietului de pește

34. De îndată ce metamorfoza este completă, regimul de hrănire constă în alimentare cu broască cu mare de calitate superioară, de exemplu, Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, SUA) (apendicele 4). În cazul broșcuțelor (puiet timpuriu), granulele sunt măcinate scurt într-un aparat de măcinat cafea sau blender ori zdrobite cu mojar și pistil pentru a reduce dimensiunea acestora. După ce puietul ajunge la o dimensiune suficient de

mare pentru a consuma granule, nu mai este necesară măcinarea sau zdrobirea. Animalele ar trebui hrănite o dată pe zi. Hrana puietului ar trebui să permită creșterea și dezvoltarea corespunzătoare a organismelor: se recomandă o greutate medie încadrată în valoarea $11,5 \pm 3$ g la puietul din martor la terminarea testului.

Chimie analitică

35. Înainte de inițierea testului, ar trebui să se determine stabilitatea substanței chimice de testat (de exemplu, solubilitatea, caracterul degradabil și volatilitatea) și toate metodele analitice necesare, de exemplu, folosind informațiile sau cunoștințele existente. Atunci când dozarea este realizată prin apa de diluție, se recomandă ca soluțiile de testat din concentrația din fiecare bazin duplicat să fie analizate înainte de începerea testului, pentru a verifica performanța sistemului. În perioada de expunere, concentrațiile substanței chimice de testat se determină la intervale adecvate, de preferință în fiecare săptămână pentru cel puțin un duplicat din fiecare grup de tratament, cu rotire între duplicate din cadrul aceluiași grup de tratament în fiecare săptămână. Se recomandă ca rezultatele să fie bazate pe concentrații măsurate. Însă, în cazul în care concentrația substanței chimice de testat în soluție a fost menținută în mod satisfăcător, pe tot parcursul testului, în limitele valorii de ± 20 % din concentrația nominală, rezultatele pot fi bazate fie pe valori nominale, fie pe cele măsurate. De asemenea, coeficientul de variație (CV) al concentrațiilor de testat măsurate pe durata testării din cadrul unui tratament ar trebui să fie menținut la maxim 20 % pentru fiecare concentrație. Atunci când concentrațiile măsurate nu rămân în intervalul de 80-120 % din concentrația nominală (de exemplu, la testarea substanțelor chimice foarte biodegradabile sau adsorbitive), ar trebui să se determine și să se exprime concentrațiile de efect în raport cu media aritmetică a concentrației în cazul testelor în regim dinamic.
36. Debitul apei de diluție și al soluției mamă ar trebui să fie verificat la intervale corespunzătoare (de exemplu, de trei ori pe săptămână) în perioada de expunere. În cazul substanțelor chimice care nu pot fi detectate la unele sau la toate concentrațiile nominale (de exemplu, din cauza degradării rapide sau a adsorbției în vasele de testare sau ca urmare a acumulării unei substanțe chimice marcate în organismele animalelor expuse), se recomandă ca rata de reînnoire a soluției de testare din fiecare cameră să fie adaptată pentru a menține concentrațiile de testare constante, în măsura posibilității.

Observații și măsurători ale punctelor finale

37. Punctele finale evaluate în cursul expunerii sunt cele care indică toxicitatea, inclusiv mortalitatea, comportamentul anormal, cum ar fi semnele clinice ale bolii și/sau toxicități generale, precum și determinările de creștere (lungime și greutate) și punctele finale ale patologiei care pot reacționa atât la toxicitatea generală, cât și la modurile endocrine de acțiune care vizează căile mediate de estrogen, androgen sau tiroidă. În plus, concentrația

de plasmă VTG poate fi măsurată, opțional, la încheierea testului. Măsurarea VTG poate fi utilă pentru înțelegerea rezultatelor studiului în contextul mecanismelor endocrine în cazul substanțelor chimice suspectate de a perturba sistemul endocrin. Punctele finale și calendarul măsurătorilor sunt sintetizate în tabelul 1.

Tabelul 1: Prezentarea punctelor finale ale LAGDA

Puncte finale*	Zilnic	Eșantionare intermediară (eșantionare larvară)	Încheierea testului (eșantionare de puieți)
Mortalitate și anomalii	X		
Timp până la etapa 62 din NF		X	
Histopatologie (glanda tiroidă)		X	
Morfometrie (creștere în greutate și lungime)		X	X
Indice somatic al ficatului (LSI)			X
Raporturile sexului genetic/fenotipic			X
Histopatologie (gonade, canale de reproducere, rinichi și ficat)			X
Vitelogenina (VTG) (opțional)			X

* Toate punctele finale sunt analizate statistic.

Mortalitate și observații zilnice

38. Toate bazinele de testare ar trebui verificate zilnic pentru identificarea exemplarelor moarte, iar mortalitatea se înregistrează pentru fiecare bazin. Exemplarele moarte ar trebui să fie îndepărtate din bazinul de testare imediat după ce au fost observate. Stadiul de dezvoltare al animalelor moarte ar trebui să fie clasificat fie ca fiind stadiul 58 din NF (apariție pre-membru anterior), stadiul 58 din NF - stadiul 62 din NF - stadiul 63 din NF - stadiul 66 din NF (între stadiul 62 din NF și absorbția completă a cozii) sau stadiul 66 după NF (etapa post-larvară). Rate ale mortalității de peste 20 % pot să indice condiții de testare necorespunzătoare sau efecte toxice evidente ale substanței chimice de testat. Animalele tind să prezinte cea mai mare sensibilitate la evenimentele de mortalitate neindusă de substanțe chimice în primele câteva zile de dezvoltare după evenimentul de depunere a icrelor și în plin proces metamorfic. O astfel de mortalitate ar putea fi evidențiată de datele de control.
39. În plus, ar trebui să se înregistreze orice observație legată de comportamentul anormal, malformații evidente (de exemplu , scolioză) sau leziuni. Observațiile referitoare la scolioza ar trebui să fie numărate (incidența) și clasificate în funcție de severitate (de

exemplu, nu este remarcabilă – NR, minim – 1, moderat – 2, sever – 3; apendicele 8). Ar trebui să se depună eforturi pentru a se asigura că limitarea prevalenței scoliozei moderate și grave (de exemplu, sub 10 % la martori) pe parcursul studiului, deși o mai mare prevalență a anomaliilor în martori nu ar constitui neapărat un motiv pentru oprirea testului. Comportamentul normal, în cazul exemplarelor larvare, este caracterizat prin suspendarea în coloana de apă cu coada ridicată deasupra capului, bătaia ritmică și regulată a înotătoarei caudale, ridicarea periodică la suprafață, opercularea și receptivitatea la stimuli. Un comportament anormal ar include, de exemplu, plutirea la suprafață, rămânerea pe fundul bazinului, înotare inversată sau neregulată, lipsa de activitate la suprafață și lipsa de reacție la stimuli. În cazul animalelor post-metamorfice, în plus față de comportamentele anormale de mai sus, ar trebui să se înregistreze diferențele mari de consum de hrană între tratamente. Malformațiile evidente și leziunile majore ar putea include anomalii morfologice (de exemplu, deformări ale membrilor), leziuni hemoragice, edem abdominal și infecții bacteriene sau fungice. Apariția leziunilor pe capul puieților, în poziția posterioară nărilor, ar putea fi indicații ale unor niveluri de umiditate insuficiente. Aceste determinări sunt calitative și ar trebui considerate analoage semnelor clinice de boală/stres și ar trebui să fie realizate prin comparații cu exemplarele din martori. În cazul în care rata apariției este mai mare la bazinele expuse decât în cazul martorilor, atunci acestea ar trebui considerate drept dovadă de toxicitate evidentă.

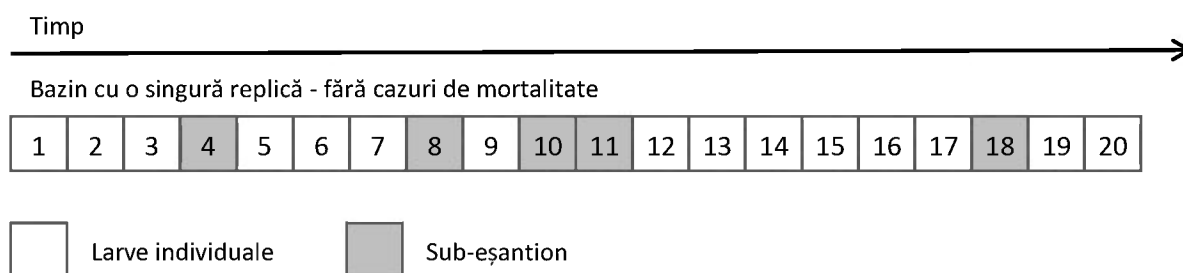
Sub-eșantionarea larvară

Prezentare generală a sub-eșantionării larvare:

40. Mormolocii care au ajuns în stadiul 62 din NF ar trebui să fie eliminați din bazine și fie eșantionați, fie mutați în următoarea parte a expunerii, într-un bazin nou, sau separați fizic de mormolocii rămași în același bazin cu un separator. Mormolocii sunt verificați în fiecare zi și se înregistrează ziua de studiu în care un mormoloc individual ajunge în stadiul 62 din NF. Caracteristica definitivă utilizată în această evaluare este forma capului. Atunci când capul a ajuns să fie redus ca dimensiune, astfel încât acesta este vizual de aproximativ aceeași lățime ca și trunchiul mormolocului, iar membrul anterior se află la nivelul părții centrale a inimii, atunci exemplarul respectiv ar fi considerat ca ajungând în stadiul 62 din NF.
41. Obiectivul este de a eșantiona un număr total de cinci mormoloci aflați în stadiul 62 din NF în fiecare bazin duplicat. Aceasta ar trebui să fie efectuată cu totul în mod aleatoriu, dar decisă *a priori*. Un exemplu ipotetic de bazin duplicat este prezentat în **figura 1**. În cazul în care există 20 de mormoloci supraviețuitori într-un anumit bazin atunci când primul exemplar ajunge în stadiul 62 din NF, ar trebui să se aleagă cinci numere aleatorii de la 1 la 20. Mormolocul nr. 1 este primul exemplar care va ajunge în stadiul 62 din NF, iar mormolocul nr. 20 este ultimul exemplar dintr-un bazin care va ajunge în stadiul 62 din

NF. În mod similar, dacă există 18 larve supraviețuitoare într-un bazin, ar trebui să se aleagă cinci numere aleatorii de la 1 la 18. Aceasta ar trebui să fie efectuată pentru fiecare bazin duplicat atunci când primul exemplar supus testării ajunge în stadiul 62 din NF. În cazul în care există rate de mortalitate în cadrul eșantionării în stadiul 62 din NF, probele rămase trebuie să fie prelevate din nou în mod aleatoriu pe baza numărului de larve rămase până în stadiul 62 din NF și a numărului de probe suplimentare necesare pentru a se ajunge la un total de cinci probe provenite din respectivul duplicat. În ziua în care un mormoloc ajunge în stadiul 62 din NF, se face trimitere la diagrama de eșantionare întocmită pentru a stabili dacă exemplarul respectiv este selectat sau separat fizic de mormolocii rămași pentru a fi expus în continuare. În exemplul prezentat (figura 1), primul exemplar care urmează să ajungă în stadiul 62 din NF (și anume, caseta nr. 1) este separat fizic de celelalte larve, este expus în continuare și este înregistrată ziua de studiu în care exemplarul ajunge în stadiul 62 din NF. Ulterior, exemplarele nr. 2 și 3 sunt tratate în același mod ca și nr. 1, iar apoi exemplarul nr. 4 este prelevat pentru creștere și histologia tiroidiană (conform acestui exemplu). Această procedură continuă până când cel de al 20-lea exemplar fie se alătură celorlalte exemplare care au trecut de stadiul 62 din NF, fie este eșantionat. Procedura de selecție aleatorie utilizată trebuie să asigure pentru fiecare organism testat probabilitatea egală de a fi selectat. Acest lucru poate fi realizat prin utilizarea oricărei metode de selecție aleatorie, dar impune, de asemenea, ca fiecare mormoloc să fie prins în plasă la un anumit moment în perioada de subeșantionare în stadiul 62 din NF.

Figura 1: Exemplu ipotetic de regim de eșantionare în stadiul 62 din NF, pentru un singur bazin duplicat.



42. Pentru subeșantionarea larvară, punctele finale obținute sunt: (1) timpul până în stadiul 62 din NF (și anume, numărul de zile între fertilizare și stadiul 62 din NF), (2) anomaliile externe, (3) morfometria (de exemplu, greutate și lungime) și (4) histologia tiroidei.

Eutanasierea mormolocilor

43. Subeșantionul de mormoloci în stadiul 62 din NF (5 exemplare per duplicat) ar trebui să fie eutanasiați prin imersiune timp de 30 de minute în cantități adecvate (de exemplu, 500 ml)

de soluție anestezică (de exemplu, 0,3 % soluție de metan sulfonat de tricaină MS-222, CAS.886-86-2). Soluția MS-222 ar trebui să fie tamponată cu bicarbonat de sodiu la o valoare a pH-ului de aproximativ 7,0, deoarece soluția MS-222 netamponată este acidă și iritantă pentru pielea broaștei, determinând o absorbție scăzută și stresarea suplimentară inutilă a organismelor.

44. Cu ajutorul unei plase de tip sită se scoate un mormoloc din camera experimentală și se transportă (plasează) în soluția de eutanasiere. Exemplarul este eutanasiat în mod corespunzător și este pregătit pentru autopsie atunci când nu reacționează la stimuli externi, cum ar fi ciupirea membrului din spate cu o pereche de forceps.

Morfometrie (greutate și lungime)

45. Măsurătorile greutatei în stare umedă (cea mai apropiată valoare mg) și lungimea bot-cloacă (SVL) (la valoarea cea mai apropiată de 0,1 mm) pentru fiecare mormoloc ar trebui efectuate imediat după ce acesta nu mai reacționează ca urmare a anesteziei (figura 2a) . Pentru măsurarea SVL dintr-o fotografie se poate utiliza un software de analiză a imaginii. Mormolocii ar trebui uscați înainte de cântărire pentru a îndepărta excesul de apă. După măsurarea dimensiunii corpului (greutate și SVL) ar trebui să se înregistreze și să se noteze orice anomalii morfologice brute și/sau orice semne clinice ale toxicității, precum scolioza (a se vedea apendicele 8), peteșile și hemoragia și se recomandă documentarea digitală. Este de precizat că peteșile reprezintă mici pete hemoragice de culoare roșie sau vișinie apărute pe piele ca urmare a rupturilor capilare.

Colectarea și fixarea țesuturilor

46. Pentru subeșantionarea larvelor, se evaluează glandele tiroide pentru histologie. Partea posterioară a trunchiului inferior până la membrele posterioare se îndepărtează și se elimină. Carcasa tăiată este fixată în fixatorul Davidson. Volumul fixatorului din rezervor ar trebui să fie de cel puțin 10 ori mai mare decât volumul aproximativ al țesuturilor. Ar trebui să se procedeze la agitarea sau circularea corespunzătoare a fixatorului pentru fixarea țesuturilor de interes. Toate țesuturile rămân în fixatorul Davidson timp de cel puțin 48 de ore, dar nu mai mult de 96 de ore, după care acestea sunt clătite cu apă deionizată și păstrate în formalină neutră tamponată 10 % (1) (29).

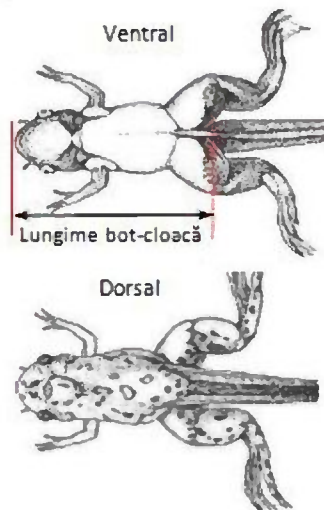
Histologia glandei

47. Fiecare subeșantion de larve (țesuturi fixe) este analizat din punct de vedere histologic în ceea ce privește glandele tiroidei, și anume diagnostic și grad de gravitate (29) (30).

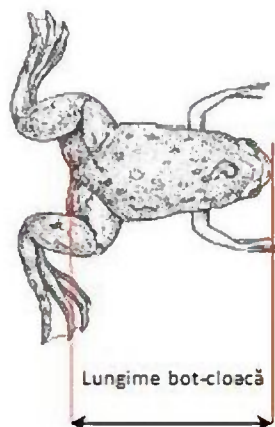
Figura 2: Repere pentru măsurarea lungimii bot-cloacă pentru LAGDA în stadiul 62 din NF (a) și pui de broască (b). Caracteristicile definitorii ale stadiului 62 din NF (a): capul prezintă aceeași lățime cu trunchiul, lungimea nervului olfactiv este mai scurtă decât diametrul bulbului olfactiv (vedere dorsală), iar membrele posterioare se află la nivelul inimii (vedere ventrală). Imagini adaptate din materialul

Nieuwkoop și Faber (1994).

a. Sub-eșantionare larvară (stadiul NF 62)



b. Eșantionare juvenilă



Sfârșitul expunerii larvare

48. Având în vedere numărul inițial de mormoloci, se preconizează că este probabil să existe un procent redus de exemplare care nu se dezvoltă normal și care nu încheie procesul de metamorfoză (stadiul 66 din NF) într-un interval rezonabil de timp. Perioada de expunere a larvelor nu ar trebui să depășească 70 de zile. Orice mormoloci rămași la finalul acestei perioade ar trebui să fie eutanasiați (a se vedea punctul 43), greutatea lor în stare umedă și SVL ar trebui să fie măsurate, aceștia ar trebui să fie clasificați pe stadii conform Nieuwkoop și Faber, 1994 și se notează orice anomalii legate de dezvoltare.

Sacrificarea după stadiul 66 din NF

49. Zece exemplare din fiecare bazin ar trebui să se dezvolte în continuare din stadiul 66 din NF (resorbția completă a cozii) până la încetarea expunerii. Prin urmare, după ce toate animalele au ajuns în stadiul 66 din NF sau după 70 de zile (oricare dintre acestea survine mai întâi), ar trebui să se procedeze la sacrificare. Animalele care au trecut de stadiul 66 din NF și care nu vor continua să fie expuse ar trebui să fie selectate în mod aleatoriu.
50. Exemplarele care nu sunt selectate pentru continuarea expunerii sunt eutanasiate (a se vedea punctul 43). Pentru fiecare exemplar se măsoară stadiul de dezvoltare, greutatea umedă și SVL (figura 2b) și se realizează o autopsie macroscopică. Sexul fenotipic (pe baza morfologiei gonadei) este notat ca sex feminin, masculin sau nedeterminat.

Eșantionare de puieți

Prezentarea eșantionării de puieți

51. Exemplarele rămase continuă să fie expuse până la 10 săptămâni după timpul median în stadiul 62 din NF, în martorul cu apa de diluție (și/sau în martorul cu solvent, dacă este cazul). La sfârșitul perioadei de expunere, animalele rămase (maximum 10 broaște pentru fiecare duplicat) sunt eutanasiate și se măsoară sau se evaluează și se înregistrează diferitele puncte finale: (1) morfometria (greutate și lungime), (2) ratele sexului fenotipic/genotipic, (3) greutatea ficatului (indicele somatic al ficatului), (4) histopatologie (gonade, canale de reproducere, ficat și rinichi) și opțional (5) valoarea VTG a plasmei.

Eutanasierea broaștelor

52. Probele de puieți, broaștele după etapa metamorfică, sunt eutanasiate printr-o injecție intraperitoneală de anestezic, de exemplu, MS-222 de 10 % într-o soluție tamponată de fosfat adecvată. Eșantionarea broaștelor poate fi efectuată după ce acestea nu mai reacționează (de obicei, în aproximativ 2 minute de la injectare, în cazul în care se utilizează MS-222 de 10 % într-o doză de 0,01 ml per gram de broască). Chiar dacă puii de broaște ar putea fi scufundați într-o concentrație mai mare de anestezic (MS-222), experiența a demonstrat că este nevoie de mai mult timp pentru ca acestea să fie anesteziate utilizând această metodă și ar fi posibil ca durata să nu fie adecvată pentru a permite eșantionarea. Injectarea asigură o eutanasiere eficientă și rapidă înainte de eșantionare. Eșantionarea nu ar trebui să înceapă până când nu este confirmată lipsa de reacție a broaștelor, pentru a se obține certitudinea că exemplarele sunt moarte. În cazul în care broaștele manifestă semne de suferință considerabilă (se poate prezice în mod sigur suferința foarte gravă și decesul) și considerați se consideră că aceștia sunt muribunzi, animalele ar trebui anesteziate și eutanasiate și tratate drept mortalitate în scopul analizei datelor. Atunci când o broască este eutanasiată din cauza morbidității, acest aspect ar trebui observat și raportat. În funcție de momentul în care broasca este eutanasiată în timpul studiului, se poate proceda la reținerea acesteia pentru analiza histopatologică (fixarea broaștei pentru o posibilă histopatologie).

Morfometrie (greutate și lungime)

53. Măsurătorile greutatei umede și ale SVL (figura 2 b) sunt identice cu cele prezentate pentru subeșantionarea larvară.

Valoarea VTG din plasmă (opțiune)

54. VTG este un marker biologic acceptat la scară largă care rezultă în urma expunerii la substanțe chimice estrogenice. În cazul LAGDA, valoarea VTG din plasmă poate fi măsurată opțional în cadrul eșantioanelor de puieți (acest lucru poate fi relevant în special în cazul în care substanța chimică de testat este suspectată ca fiind un estrogen).

55. Membrele posterioare ale puieților eutanasiați sunt tăiate, iar sângele este colectat cu ajutorul unui capilar heparinizat (deși ar putea fi adecvate metode alternative de colectare a sângelui, cum ar fi puncția cardiacă). Sângele este expulzat într-o eprubetă de microcentrifugă (de exemplu, cu un volum de 1,5 ml) și centrifugat pentru obținerea plasmei. Probele de plasmă ar trebui păstrate la o temperatură de cel mult -70 °C până la determinarea VTG. Concentrația VTG din plasma poate fi măsurată printr-un test de imunoabsorbție cu anticorpi marcați enzimatic (ELISA) (apendicele 6) sau printr-o metodă alternativă, cum ar fi spectrometria de masă (31). Se preferă anticorpi specifici speciei datorită unei sensibilități sporite.

Determinarea sexului genetic

56. Sexul genetic al fiecărui pui de baltă este evaluat pe baza markerilor dezvoltați de Yoshimo *et al.* (11). Pentru determinarea sexului genetic, se colectează și se păstrează (parțial sau integral), într-o eprubetă de microcentrifugă, un membru posterior (sau orice alt țesut) îndepărtat în timpul disecției (la broaște, pot fi obținute probe din orice țesut). Țesuturile pot fi păstrate la temperatura de -20 °C sau la temperaturi mai mici până la izolarea acidului dezoxiribonucleic (ADN). Izolarea ADN-ului din țesuturi poate fi realizată cu ajutorul unor kituri disponibile în comerț, iar analiza pentru detectarea prezenței sau absenței marcatorului este efectuată printr-o metodă de reacție în lanț a polimerazei (PCR) (apendicele 5). În general, concordanța dintre sexul histologic și genotip între animalele din grupul martor la momentul eșantionării puieților în grupurile martor este mai mare de 95 %.

Colectarea și fixarea țesuturilor pentru histopatologie

57. Gonadele, canalele de reproducere, rinichii și ficatul sunt colectate pentru analiza histologică în timpul eșantionării finale. Se deschide cavitatea abdominală și se disecă și se cântărește ficatul. Apoi, se îndepărtează cu atenție organele digestive (de exemplu, stomacul, intestinele) din partea inferioară a abdomenului pentru a evidenția gonadele, rinichii și canalele de reproducere. Ar trebui să fie notate orice anomalii morfologice evidente ale gonadelor. În cele din urmă, ar trebui îndepărtate membrele posterioare dacă nu au fost îndepărtate în prealabil în vederea colectării sângelui. Ficatul colectat și carcasa cu gonadele lăsate *in situ* ar trebui să fie introduse imediat în fixatorul Davidson. Volumul fixatorului din rezervor ar trebui să fie de cel puțin 10 ori mai mare decât volumul aproximativ al țesuturilor. Toate țesuturile rămân în fixatorul Davidson timp de cel puțin 48 de ore, dar nu mai mult de 96 de ore, după care acestea sunt clătite cu apă deionizată și păstrate în formalină neutră tamponată 10 % (1) (29).

Histopatologie

58. Fiecare eșantion de puiet este supus evaluării histologice pentru identificarea patologiei la gonade, canale de reproducere, rinichi și țesut hepatic, și anume diagnostic și grad de

gravitate (32). Din această evaluare reiese, de asemenea, fenotipul gonadei (de exemplu, ovar, testicul, hermafrodit) și, împreună cu măsurătorile individuale ale sexului genetic, aceste observații pot fi utilizate pentru a calcula raporturile sexului fenotipic/genotipic.

RAPORTAREA DATELOR

Analiza statistică

59. LAGDA generează trei forme de date de analizat din punct de vedere statistic: (1) date continue cantitative (greutate, SVL, LSI, VTG), (2) date despre timpul până la evenimente pentru ratele de dezvoltare (și anume, zile până la stadiul 62 din NF de la momentul inițierii testului) și (3) date ordinale sub formă de punctaje de severitate sau stadii de dezvoltare obținute în urma evaluărilor histopatologice.
60. Se recomandă ca modelul testului și selecția testului statistic să permită existența unei puteri adecvate pentru detectarea schimbărilor de importanță biologică în punctele finale în cazul în care va fi raportată valoarea CFEO sau CEx. Analizele statistice ale datelor (în general, baza medie a duplicatelor) ar trebui, de preferință, să urmeze procedurile descrise în documentul intitulat „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application” (33) (Metode actuale de analiză statistică a datelor privind ecotoxicitatea: un ghid pentru aplicare). Apendicele 7 al acestei metode de testare prezintă arborele decizional de analiză statistică recomandat și orientarea pentru tratarea datelor și alegerea celui mai adecvat test sau model statistic care să fie utilizat în LAGDA.
61. Datele provenite din eșantionarea puieților (de exemplu, creștere, LSI) ar trebui să fie analizate pentru fiecare sex genotipic separat, deoarece sexul genotipic este determinat pentru toate broaștele.

Considerații privind analiza datelor

Utilizarea de duplicate și tratamente compromise

62. Duplicatele și tratamentele pot fi compromise din cauza excesului de mortalitate prin toxicitate evidentă, boală sau eroare tehnică. Dacă un tratament este compromis din cauza unei boli sau a unei erori tehnice, ar trebui să existe trei tratamente necompromise cu trei duplicate necompromise disponibile pentru analiză. În cazul în care apare o toxicitate evidentă la tratamentul (tratamentele) puternic(e), este de preferat ca cel puțin trei niveluri de tratament cu trei duplicate necompromise să fie disponibile pentru analiză [în concordanță cu abordarea privind concentrația maximă tolerată din orientările OCDE privind testele (34)]. În plus față de mortalitate, semnele de toxicitate evidentă pot include efecte comportamentale (de exemplu, plutirea la suprafață, stagnarea pe fundul bazinului, mișcarea inversă sau neregulată, lipsa activității de revenire la suprafață), leziuni

morfologice (de exemplu, leziuni hemoragice, edem abdominal) sau inhibarea reacțiilor alimentare normale la compararea calitativă cu exemplarele martor.

Martorul tratat cu solvent

63. La încheierea testului, ar trebui efectuată o evaluare a potențialelor efecte ale solventului (dacă se utilizează). Aceasta se realizează printr-o comparație statistică între grupul de martori solvent și grupul de martori apă de diluție. Cele mai relevante puncte finale care trebuie luate în considerare în această analiză sunt factorii determinanți ai creșterii (greutate și lungime), deoarece aceștia pot fi afectați prin toxicități generalizate. În cazul în care se detectează diferențe semnificative din punct de vedere statistic la aceste puncte finale între grupul cu martor tratat cu apă de diluție și grupul cu martor tratat cu solvent, ar trebui să se recurgă la cea mai bună apreciere profesională pentru a determina dacă validitatea testului este compromisă. În cazul în care cei doi martori diferă, tratamentele expuse la substanța chimică ar trebui comparate cu martorul tratat cu solvent, cu excepția cazului în care se cunoaște faptul că se preferă o comparație cu martorul tratat cu apă de diluție. În cazul în care nu există diferențe semnificative din punct de vedere statistic între cele două grupuri cu martori, se recomandă ca tratamentele expuse la substanța chimică de testat să fie comparate cu cele ale grupului (grupul cu martor tratat cu solvent și grupul cu martor tratat cu apă de diluție), cu excepția cazului în care se cunoaște faptul că se preferă numai comparația cu grupul cu martor tratat cu apă de diluție sau cu grupul cu martor tratat cu solvent.

Raportul testului

64. Raportul testului ar trebui să includă următoarele:

Substanța chimică de testat:

- proprietăți de natură fizică și, dacă este relevant, proprietăți fizico-chimice;
- Substanță monocomponentă:
 - 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).
- 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 constituenților.

Specii de testare:

- numele științific, sușa, dacă există, sursa și metoda de colectare a ouălor fertilizate, precum și manipularea ulterioară.
- incidența scoliozei la martorii istorici pentru cultura mamă utilizată.

Condiții de testare:

- perioada (perioadele) de expunere la lumină;
- modelul de testare (de exemplu, dimensiunea camerei, volumul materialului și al apei, numărul camerelor de testare și al duplicatelor, numărul organismelor de testare pe duplicat);
- metoda de preparare a soluțiilor mamă și frecvența reînnoirii (ar trebui să se specifice agentul de solubilizare și concentrația sa, atunci când este folosit);
- metoda de dozare a substanței chimice de testat (*de exemplu*, pompe, sisteme de diluare);
- eficiența de recuperare a metodei și concentrațiile de testare nominale, limita de cuantificare, mediile valorilor măsurate și abaterile lor standard în vasele de testare și metoda prin care acestea au fost obținute, precum și dovezi că măsurătorile se referă la concentrațiile substanței de testat în soluție reală;
- caracteristicile apei de diluție: pH, duritate, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat, nivelul clorului rezidual (dacă a fost măsurat), iodul total, carbonul organic total (dacă a fost măsurat), solide în suspensie (dacă au fost măsurate), salinitatea mediului de testare (dacă a fost măsurată) și alte măsurători făcute;
- concentrațiile de testare nominale, mediile valorilor măsurate și deviațiile standard ale acestora;
- calitatea apei din vasele de testare, pH, temperatură (zilnic) și concentrația oxigenului dizolvat;
- informații precise legate de hrană [*de exemplu*, tipul de aliment(e), sursa, cantitatea administrată și frecvența].

Rezultate:

- dovezi privind faptul că martorii au îndeplinit criteriile de validitate;
- date privind martorul (plus martorul tratat cu solvent, atunci când este utilizat) și grupurile de tratament, după cum urmează: mortalitatea și anomaliile observate, timpul până la etapa NF 62, evaluarea histologiei tiroidei (doar proba de larve), creșterea (greutatea și lungimea), LSI (numai proba de pești tineri), ratele sexului genetic/fenotipic (numai pentru proba de pești tineri), rezultatele examenului histopatologic pentru gonade, canalele de

reproducere, rinichi și ficat (numai proba de pești tineri) și valoarea VTG a plasmei (numai pentru proba de pești tineri, dacă este prelevată);

- abordarea analizei statistice și a tratării datelor (testul statistic sau modelul utilizat);
- concentrația fără efect observat (CFEO) pentru fiecare răspuns evaluat;
- concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) pentru fiecare răspuns evaluat (la $\alpha = 0,05$); CEx pentru fiecare răspuns evaluat, dacă este cazul, precum și intervalele de încredere (*de exemplu* 95 %) și un grafic al modelului ajustat utilizat pentru calcularea lor, panta curbei concentrație-răspuns, formula modelului de regresie, parametrii estimați ai modelului și erorile standard ale acestora.
- orice abatere de la metoda de testare și abateri de la criteriile de acceptare, precum și considerații privind eventualele consecințe asupra rezultatului testului.

65. Pentru rezultatele măsurărilor punctelor finale, ar trebui să fie prezentate valorile medii și deviațiile lor standard (în funcție de duplicat și concentrație, dacă este posibil).

66. Timpul mediu până la etapa NF 62 ar trebui calculat și prezentat ca medie a medianelor duplicatelor și a deviației standard a acestora. De asemenea, pentru tratamente, o medie de tratament ar trebui calculată și prezentată ca medie a medianelor duplicatelor și a deviației standard a acestora.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- (1) Agenția SUA pentru protecția mediului (2013). Validarea testului privind creșterea și dezvoltarea larvelor de amfibieni: Integrated Summary Report.
- (2) OCDE (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 150), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.
- (3) Nieuwkoop PD și Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, SUA.
- (4) Kloas W și Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16-27.
- (5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.
- (6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.
- (7) Villalpando I și Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.
- (8) Miyata S, Koike S și Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.
- (9) Mikamo K și Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.
- (10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K și Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.
- (11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T și Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

- (12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S și Degitz SJ. (2009) b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.
- (13) Tobias ML, Tomasson J și Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441-448.
- (14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR și Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.
- (15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A și Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.
- (16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, SUA.
- (17) Capitolul C.4 din prezenta anexă, Test de biodegradabilitate rapidă.
- (18) Capitolul C.29 din prezenta anexă, Biodegradabilitatea rapidă - CO₂ în vase închise ermetic (testul Headspace).
- (19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL și Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.
- (20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.
- (21) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 23), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.
- (22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ și Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

- (23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, SUA.
- (24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.
- (25) Capitolul C.38 din prezenta anexă, Analiza metamorfozei la amfibieni.
- (26) Capitolul C.48 din prezenta anexă, Analiza reproducerii pe termen scurt la pești.
- (27) Capitolul C.41 din prezenta anexă, Testul de dezvoltare sexuală a peștilor.
- (28) Capitolul C.49 din prezenta anexă, Testul de toxicitate acută la embrionii de pești (FET).
- (29) OCDE (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (nr. 82) Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.
- (30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC și Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.
- (31) Luna LG și Coady K. (2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.
- (32) OCDE (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 228), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.
- (33) OCDE (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 54), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.
- (34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

Apendicele 1

DEFINIȚII

Punctele finale apicale: care provoacă efecte la nivel de populație.

Substanță chimică: o substanță sau un amestec

ELISA: test de imunoadsorbtie cu anticorpi marcați enzimatic

CEx: (concentrație efectivă pentru un efect x %) reprezintă concentrația care determină o valoare x % a unui efect asupra organismelor testate într-un timp de expunere dat în comparație cu un martor. De exemplu, o valoare EC50 este concentrația estimată să producă un efect asupra unui punct final de testare la 50% dintr-o populație expusă într-un timp de expunere stabilit.

zdf: Zile după fertilizare

Test în regim dinamic: un test cu flux continuu de soluții de testare prin sistemul de testare în perioada de expunere.

Axa HPG: axul hipotalamo-hipofizo-gonadal

IUPAC: Uniunea Internațională de Chimie Pură și Aplicată.

Concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) este cea mai scăzută concentrație testată a unei substanțe chimice de testat la care se constată un efect de reducere semnificativ din punct de vedere statistic asupra creșterii (la $p < 0,05$) în comparație cu martorul. Însă toate concentrațiile de testare mai mari decât LOEC ar trebui să aibă un efect nociv egal cu sau mai mare decât cele observate la LOEC. Atunci când aceste două condiții menționate nu pot fi îndeplinite, ar trebui furnizată o explicație completă a modului de alegere a LOEC (și, prin urmare, CFEO). Apendicele 7 oferă orientări în acest sens.

Concentrația letală medie (LC50): este concentrația unei substanțe chimice de testat care este considerată letală la 50 % din organismele testate pe durata testului.

Concentrația fără efect observat (CFEO) este concentrația de testare imediat sub LOEC care, atunci când este comparată cu martorul, nu are niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) într-un timp de expunere stabilit.

SMILES: Specificație pentru înregistrarea simplificată a structurii moleculare sub formă de text liniar.

Substanța 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.

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**ANUMITE CARACTERISTICI CHIMICE ALE APEI DE DILUȚIE ACCEPTABILE**

Substanță	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
Total pesticide organoclorurate plus bifenili policlorurați	50 ng/l
Total clor organic	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

CONDIȚII DE TESTARE PENTRU LAGDA

1. Specia de testare	<i>Xenopus laevis</i>
2. Tipul de testare	Continuu în regim dinamic
3. Temperatura apei	Temperatura nominală este de 21 °C. Temperatura medie pe durata testului este de 21 ± 1 °C (diferențele între duplicate și între tratamente nu ar trebui să depășească 1,0 °C)
4. Calitatea iluminatului	Becuri fluorescente (spectru larg) de 600-2000 lucși (lumeni/m ²) la suprafața apei
5. Perioadă de expunere la lumină	12 h de lumină, 12 h de întuneric
6. Volumul soluției de testare și vasul de testare (bazin)	4 - 10 l (adâncime a apei de minimum 10-15 cm) Bazin din sticlă sau oțel inoxidabil
7. Schimburile de volum ale soluțiilor de testare	Constante, având în vedere menținerea condițiilor biologice și expunerea la substanța chimică (de exemplu, 5 reînnoiri pe zi ale volumului în bazin)
8. Vârsta organismelor de testare la inițiere	stadiile 8-10 din Nieuwkoop și Faber (NF)
9. Numărul de organisme per duplicat	20 de exemplare (embrioni)/bazin (duplicat) în momentul inițierii expunerii și 10 exemplare (exemplare tinere)/bazin (duplicat) după stadiul 66 din NF până la încetarea expunerii
10. Număr de tratamente	Minim 4 tratamente cu substanțe chimice de testat, plus martorul (martorii) adecvat (adecvați)
11. Numărul de duplicate per tratament	4 duplicate per tratament pentru substanța chimică de testat și 8 duplicate pentru martor(i)
12. Numărul de organisme per concentrație de testare	Minim 80 de duplicate per tratament pentru substanța chimică de testat și 160 de duplicate pentru martor(i)
13. Apa de diluție	Orice apă care permite creșterea și dezvoltarea normală a speciei <i>X. laevis</i> (de exemplu, apă de izvor sau apă de la robinet filtrată cu cărbune)
14. Aerarea	Nu este necesară, dar este posibilă aerarea bazinelor în cazul în care nivelurile de oxigen dizolvat scad sub limitele recomandate, iar creșterea debitului soluției de testare este maximizată.

15. Oxigenul dizolvat din soluția de testare	Oxigen dizolvat: ≥ 40 % din valoarea saturației aerului sau $\geq 3,5$ mg/l
16. pH-ul soluției de testare	6,5-8,5 (diferențele între tratamente și între duplicate nu ar trebui să depășească 0,5)
17. Duritatea și alcalinitatea soluției de testare	10-250 mg CaCO_3 /l
18. Regimul de hrănire	(A se vedea apendicele 4)
19. Perioadă de expunere	Din stadiile 8-10 din NF până la zece săptămâni după perioada mediană până la stadiul 62 din NF în grupul martor cu apă și/sau cu solvent (maxim 17 săptămâni)
20. Puncte finale biologice	Mortalitatea (și anomalii aparente), timpul până la stadiul 62 din NF (eșantion de larve), evaluarea histologiei tiroidei (eșantion de larve), creșterea (greutatea și lungimea), indicele somatic al ficatului (eșantionul de puiști), ratele sexului genetic/fenotipic (eșantionul de puiști), histopatologia pentru gonade, canalele de reproducere, rinichi și ficat (eșantion de puiști) și valoarea VTG din plasmă (opțional, eșantionul de puiști)
21. Criterii de validitate a testului	Oxigenul dizolvat ar trebui să fie de > 40 % din valoarea saturației aerului; temperatura medie a apei ar trebui să fie în limitele valorii de 21 ± 1 °C, iar diferențele între duplicate și între tratamente ar trebui să fie $< 1,0$ °C; pH-ul soluției de testare ar trebui să fie cuprins între 6,5 și 8,5; mortalitatea în martor ar trebui să fie ≤ 20 % în fiecare duplicat, iar perioada medie până la stadiul 62 din NF în martor ar trebui să fie ≤ 45 zile; greutatea medie a organismelor de testat în etapa 62 din NF și la încheierea testului la martori și martori tratați cu solvent (dacă se utilizează) ar trebui să atingă $1,0 \pm 0,2$ și, respectiv, $11,5 \pm 3$ g; ar trebui să existe dovezi care să demonstreze menținerea satisfăcătoare în soluție a concentrațiilor substanței chimice de testat în limitele a ± 20 % din valorile medii măsurate.

Apendicele 4

REGIM DE HRĂNIRE

Ar trebui remarcat faptul că, deși se recomandă acest regim de hrănire, sunt permise alternative, cu condiția ca organismele de testare să crească și să se dezvolte într-un ritm corespunzător.

Hrănirea larvelor

Pregătirea alimentației larvelor

- A. 1:1 (v/v) Trout Starter: alge/TetraFin® (sau un produs echivalent);
1. Trout Starter: se amestecă 50 g de Trout Starter (granule mici sau praf) și 300 ml de apă filtrată adecvată într-un blender la viteză mare timp de 20 de secunde
 2. un amestec alge/TetraFin® (sau un produs echivalent); se amestecă 12 g de dischete de alge spirulină și 500 ml de apă filtrată într-un blender la viteză mare timp de 40 de secunde, se amestecă 12 g de TetraFin® (sau un produs echivalent) cu 500 ml de apă filtrată, iar apoi acestea se combină pentru a constitui 1 l de 12 g/l alge spirulină și 12 g/l TetraFin® (sau un produs echivalent).
 3. Se combină volume egale din amestecul Trout Starter și din amestecul alge/TetraFin® (sau un produs echivalent)
- B. Creveți în saramură:

15 ml de ouă de creveți în saramură sunt sparte într-un litru de apă sărată (preparată prin adăugarea a 20 ml NaCl la 1 l de apă deionizată). Creveții în saramură sunt recoltați după aerarea timp de 24 de ore la temperatura ambiantă sub lumină constantă. Pe scurt, se permite așezarea creveților în saramură timp de 30 de minute prin oprirea aerării. Chisturile care plutesc în partea superioară a recipientului cilindric sunt deversate și eliminate, iar creveții sunt trecuți prin filtre corespunzătoare și aduși la 30 ml cu apă filtrată.

Protocolul de hrănire

Tabelul 1 cuprinde o referință cu privire la tipul și cantitatea de hrană utilizată în stadiile larvare ale expunerii. Exemplarele ar trebui să fie hrănite de trei ori pe zi, de luni până vineri, și o dată pe zi în weekend.

Tabelul 1: Regimul de hrănire pentru larvele *X. laevis* în condiții dinamice

Timp* (După fertilizare)	Trout Starter: alge/TetraFin®sau un produs echivalent)		Creveți în saramură	
	În timpul săptămânii (de trei ori pe zi)	În weekend (o dată pe zi)	În timpul săptămânii (de două ori pe zi)	În weekend (o dată pe zi)

Zilele 4-14 (în săptămânile 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (în zilele 8-15)	0,5 ml (în zilele 8-15)
Săptămâna 2	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (din ziua 16)	1 ml (din ziua 16)
Săptămâna 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Săptămâna 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Săptămâna 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Săptămâna 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Săptămâna 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Săptămânile 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

* Ziua 0 este definită ca fiind ziua în care este realizată injecția hCG.

Tranziția de la regimul alimentar larvar la cel pentru puiet

Atunci când larvele încheie metamorfoza, acestea trec la o formulă de regim alimentar pentru puiet, care este explicată în continuare. În timpul acestei tranziții, regimul alimentar al larvelor ar trebui redus pe măsură ce crește cantitatea de hrană pentru puiet. Acest lucru se poate realiza prin scăderea proporțională a hranei larvare și, în același timp, creșterea proporțional a hranei pentru puiet, pe măsură ce fiecare grup de cinci mormoloci depășesc stadiul 62 din NF și se apropie de încheierea metamorfozei în stadiul 66 din NF.

Hrana puietului de pește

Regimul alimentar pentru puiet

După încheierea metamorfozei (stadiul 66), regimul alimentar se schimbă doar în cazul alimentației pentru broasca de mare de calitate superioară de 3/32 inch (Xenopus Express™, FL, SUA) sau o cantitate echivalentă.

Prepararea granulelor zdrobite pentru tranziția de la stadiul larvar la cel de puiet

Granulele alimentare pentru broasca de mare sunt măcinate pentru un timp scurt într-un aparat de măcinat cafea, un blender sau un mojar și pistil pentru a reduce dimensiunea granulelor cu aproximativ 1/3. Prin procesarea excesivă se produce praf, ceea ce nu este încurajat.

Protocolul de hrănire

Tabelul 2 cuprinde o referință cu privire la tipul și cantitatea de hrană utilizată în stadiul de puiet și de adult. Animalele ar trebui hrănite o dată pe zi. Ar trebui menționat că, în timpul metamorfozei exemplarelor, acestea continuă să primească o porțiune din creveții în saramură până când > 95 % din exemplare încheie metamorfoza.

Exemplarele nu ar trebui să fie hrănite în ziua încheierii testului, pentru ca hrana să nu distorsioneze măsurătorile greutatei.

Tabelul 2: Regimul de hrănire pentru puietii *X. laevis* în condiții dinamice. Ar trebui remarcat faptul că exemplarele nemetamorfozate, inclusiv cele a căror metamorfoză a fost întârziată de tratamentul chimic, nu pot mânca granule nezdrobite.

Timpul (Săptămâni după data metamorfozei mediane)	Volum granule zdrobite (mg pe pui de broască)	Volum granule integrale (mg pe pui de broască)
Când exemplarele încheie metamorfoza	25	0
Săptămânile 0-1	25	28
Săptămânile 2-3	0	110
Săptămânile 4-5	0	165
Săptămânile 6-9	0	220

* Prima zi din săptămâna 0 este data metamorfozei mediane la exemplarele din martor.

Apendicele 5

DETERMINAREA SEXULUI GENETIC (SEXARE GENETICĂ)

Metoda de stabilire a sexului genetic pentru *Xenopus laevis* se bazează pe studiul lui Yoshimoto *et al.*, 2008. Dacă este necesar, pot fi obținute proceduri în detaliu din această publicație. Dacă se consideră adecvat, pot fi utilizate metode alternative (de exemplu, qPCR de mare capacitate).

Primaze *X. laevis*

Marker DM-W

Direct: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Invers: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Martor pozitiv

Direct: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Invers: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Purificarea ADN

Purificarea ADN din țesut muscular sau cutanat, utilizând, de exemplu, kitul Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (cat. nr. 69506) sau un produs similar în conformitate cu instrucțiunile kitului. ADN-ul poate fi eluat din coloanele de centrifugare utilizând mai puțină soluție-tampon pentru a genera eșantioane mai concentrate dacă acest lucru se consideră necesar pentru PCR. Este de precizat că ADN-ul este destul de stabilă, așadar ar trebui să se acorde atenție evitării contaminării încrucișate care ar putea conduce la o caracterizare greșită a masculilor ca femele, sau invers.

PCR

Un model de protocol care utilizează JumpStart™ Taq de la Sigma este prezentat în **tabelul 1**.

Tabelul 1: Model de protocol care utilizează JumpStart™ Taq de la Sigma

Amestec principal	1x (μl)	[Final]
NFW	11	-

10 X soluție tampon	2,0	-
MgCl ₂ (25mM)	2,0	2,5 mm
dNTP (10 mm fiecare)	0,4	200 μM
Marker pentru primază (8 μM)	0,8	0,3 μM
Marker invers pentru primază (8 μM)	0,8	0,3 μM
Martor pentru primază (8 μM)	0,8	0,3 μM
Martor invers pentru primază (8 μM)	0,8	0,3 μM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 unități/μl
Model ADN	1,0	~200 pg/μl

Notă: La pregătirea amestecurilor principale, se pregătesc cantități suplimentare pentru a completa orice pierderi care ar putea apărea în timp introducerii cu pipeta (de exemplu: 25x ar trebui să se folosească doar pentru 24 de reacții).

Reacție:

Amestec principal 19,0 μl

Model 1,0 μl

Total 20,0 μl

Profil Thermocycler:

Etapa 1. 94 °C 1 min

Etapa 2. 94 °C 30 sec

Etapa 3. 60 °C 30 sec

Etapa 4. 72 °C 1 min

Etapa 5. Treceți la etapa 2. 35 de cicluri

Etapa 6. 72 °C 1 min

Etapa 7. 4 °C menținere

Produsele PCR pot fi testate imediat într-un gel sau păstrate la 4 °C.

Electroforeză în gel de agaroză (3 %) (model de protocol)

50X TAE

Tris 24,2 g
 Acid acetic glacial 5,71 ml
 Na₂ (EDTA)·2H₂O 3,72 g
 Se adaugă apă la 100 ml

1X TAE

H₂O 392 ml
 50X TAE 8 ml

3:1 Agaroză

3 părți de agaroză NuSieve™ GTG™
 1 partea de agaroză Fisher electroendosmoză scăzută (EEO)

Metoda

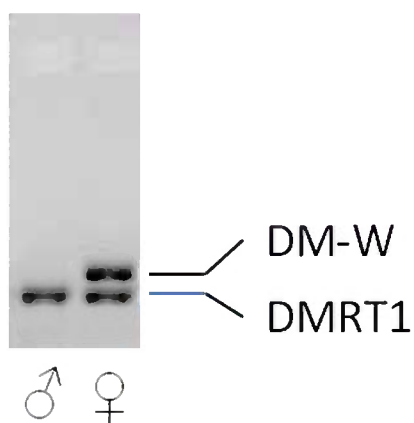
1. Se prepară un gel de 3 % prin adăugarea a 1,2 g de amestec cu agaroză la 43 ml 1X TAE. Se agită pentru a desface bucățile mari.
2. Amestecul cu agaroză se încălzește în cuptorul cu microunde până la dizolvarea completă (a se evita fierberea). Se lasă să se răcească lent.
3. Se adaugă 1,0 μL de bromură de etidiu (10 mg/ml). Se rotește balonul. Trebuie remarcat faptul că bromura de etidiu este mutagenă, așadar ar trebui să se utilizeze pentru această etapă substanțele chimice alternative, în măsura în care acest lucru este posibil din punct de vedere tehnic, pentru a reduce riscurile pentru sănătatea lucrătorilor¹.
4. Se toarnă gel în formă cu pieptenele. Se răcește complet.
5. Se adaugă gel în aparat. Se acoperă gelul cu 1X TAE.
6. Se adaugă 1 μl de 6x colorant de încărcare la fiecare 10 μl de produs PCR.
7. Se introduc eșantioane în godeuri cu pipeta.

¹ În conformitate cu articolul 4.1 din Directiva 2004/37/CE a Parlamentului European și a Consiliului din 29 aprilie 2004 privind protecția lucrătorilor împotriva riscurilor legate de expunerea la agenți cancerigeni sau mutageni la locul de muncă [a șasea directivă specială în sensul articolului 16 alineatul (1) din Directiva 89/391/CEE a Consiliului] (JO L 158, 30.4.2004, p. 50).

8. Se analizează la 160 de volți constant timp de ~ 20 de minute.

În **figura 1** este prezentată o imagine de gel de agaroză care indică modele de exemplare de sex masculin și feminin.

Figura 1: Imagine cu gel de agaroză care indică modelul orientativ de bandă pentru un exemplar masculin (♂), (bandă unică ~ 203 pb: DMRT1) și un exemplar femelă (♀) (două benzi la ~ 259 bp: DM-W și 203 bp:DMRT1).



REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2469-2474.

Apendicele 6

MĂSURAREA VITELOGENINEI

Măsurarea vitelogeninei (VTG) se face utilizând o metodă de analiză de imunoabsorbție cu anticorpi marcați enzimatic (ELISA), care a fost dezvoltată inițial pentru VTG a speciei fathead minnow (Parks *et al.*, 1999). În prezent, nu există anticorpi disponibili în comerț pentru *X. laevis*. Cu toate acestea, având în vedere abundența de informații pentru această proteină și disponibilitatea unor servicii de producție de anticorpi în comerț eficiente din punctul de vedere al costurilor, este rezonabil ca laboratoarele să poată desfășura cu ușurință un test ELISA pentru a efectua această măsurătoare (Olmstead *et al.*, 2009). De asemenea, Olmstead *et al.* (2009) oferă o descriere a analizei, astfel cum a fost modificată pentru VTG la *X. tropicalis*, prezentată în continuare. Metoda utilizează un anticorp realizat împotriva VTG a speciei *X. tropicalis*, dar este cunoscută, de asemenea, ca fiind aplicabilă pentru VTG a speciei *X. laevis*. Ar trebui remarcat faptul că pot fi utilizate, de asemenea, testele ELISA necompetitive și că este posibil ca acestea să aibă limite de detecție mai mici decât metoda descrisă mai jos.

Materiale și reactivi

- Ser cu primul anticorp (Ab) pre-adsorbit

Se amestecă o parte de ser Anti-*X. tropicalis* VTG cu primul Ab cu două părți de plasmă de mascul cu martor și se lasă la temperatura camerei timp de ~ 75 de minute, se așează soluția pe gheață timp de 30 de minute, se centrifughează > 20K x G timp de 1 oră la 4 °C, se elimină supernatantul, partea alicotă și se păstrează la -20 °C.

- Al doilea anticorp

Conjugat Goat Anti-Rabbit IgG-HRP (de exemplu, Bio-Rad 172-1019)

- Standard VTG

VTG de *X. laevis* purificat la 3,3 mg/ml.

- TMB (3,3',5,5' tetrametil-benzidină) (de exemplu, KPL 50-76-00; sau Sigma T0440)
- Ser normal de găscă (NGS) (de exemplu, Chemicon® S26-100 ml)
- Plăci de microtitrare din polistiren EIA de 96 de godeuri (de exemplu, ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)
- Cuptor de hibridizare la temperatură de 37 °C (sau un incubator de aer cu echilibrare rapidă) pentru plăci, baie de apă pentru eprubete
- Alte echipamente de laborator, substanțe chimice și consumabile.

Rețete

Soluție-tampon de acoperire (50 mM de soluție-tampon carbonat, pH 9,6):

NaHCO ₃	1,26 g
Na ₂ CO ₃	0,68 g
apă	428 ml

10X PBS (0,1 M fosfat, 1,5 M NaCl):

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,83 g
Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O	20,1 g
NaCl	71 g
apă	810 ml

Soluție-tampon de spălare (PBST):

10X PBS	100 ml
apă	900 ml

Se ajustează pH-ul la 7,3 cu 1 M HCl, apoi se adaugă 0,5 ml Tween-20

Soluție-tampon de analiză:

Ser normal de gâscă (NGS)	3,75 ml
Soluție-tampon de spălare	146,25 ml

Eșantionare

Sângele se recoltează cu o eprubetă microhematocrită heparinizată și se așează pe gheață. După centrifugare timp de 3 de minute, eprubeta este punctată, se deschide, iar plasma este expulzată în eprubete de microcentrifugare de 0,6 ml care conțin 0,13 unități de aprotinină liofilizată. (Acele eprubete sunt preparate în prealabil prin adăugarea cantității adecvate de aprotinină, congelare și liofilizare într-un concentrator de tip speed-vac la căldură redusă până la uscare.) Plasma se păstrează la -80 °C până la analiză.

Procedura pentru o singură placă

Acoperirea plăcii

Se amestecă 20 μl de VTG purificată cu 22 ml de soluție-tampon de carbonat (final 3 μg/ml). Se adaugă 200 μl în fiecare godeu de pe o placă cu 96 de godeuri. Se acoperă placa cu o peliculă de adeziv de etanșare și se lasă la incubat peste noapte la 37 °C pentru 2 ore (sau la 4 °C peste noapte).

Blocarea plăcii

Soluția de blocare este preparată prin adăugarea a 2 ml de Normal Goat Serum (NGS) la 38 ml de soluție-tampon de carbonat. Se îndepărtează soluția de acoperire și se agită conținutul uscat. Se adaugă 350 μ l de soluție de blocare în fiecare godeu. Se acoperă cu o peliculă de adeziv de etanșare și se incubează peste noapte la 37 °C pentru 2 ore (sau la 4 °C peste noapte).

Prepararea standardelor

5,8 μ l de VTG standard purificat se amestecă cu 1,5 ml de soluție-tampon de analiză într-o eprubetă de testare din sticlă de borosilicat de unică folosință de 12 $\times$ 75 mm. Se obține astfel o cantitate de 12 760 ng/ml. Apoi se efectuează o diluție în serie prin adăugarea de 750 μ l din diluția anterioară la 750 μ l de soluție-tampon de analiză pentru a genera concentrații finale de 12 760, 6380, 3190, 1595, 798, 399, 199, 100 și 50 ng/ml.

Prepararea eșantioanelor

Se începe cu o diluție de 1:300 (de exemplu, se combină 1 μ l de plasmă cu 299 μ l de soluție-tampon de analiză) sau de 1:30 de plasmă în soluție-tampon de analiză. În cazul în care se preconizează o cantitate mare de VTG, pot fi necesare diluții suplimentare sau mai mari. Încercați să mențineți B/B₀ în intervalul standardelor. În cazul eșantioanelor care nu au o valoare VTG apreciabilă, de exemplu, martorii masculi și femele (care sunt toți imaturi), se utilizează diluția de 1:30. Eșantioanele, diluate mai puțin de această valoare, pot prezenta efecte de matrice nedorite.

În plus, se recomandă să se analizeze un eșantion de martor pozitiv pe fiecare placă. Acesta provine dintr-o rezervă de plasmă care conține niveluri de VTG puternic induse. Rezerva este diluată inițial în NGS, împărțită în părți alicote și păstrată la -80 C. Pentru fiecare placă o parte alicotă se congelează, se diluează apoi în soluție-tampon de analiză și se testează similar unui eșantion de testare.

Incubația cu primul anticorp

Primul anticorp este pregătit prin efectuarea unei diluții de 1:2 000 a serului cu primul anticorp pre-adsorbit în soluția-tampon de analiză (de exemplu, soluție-tampon de analiză 8 μ l-16 ml). Se combină 300 μ l din soluția cu primul anticorp cu 300 μ l de eșantion/soluție standard într-o eprubetă de sticlă. Eprubeta B₀ se prepară în mod similar cu 300 μ l de soluție-tampon de analiză și 300 μ l de anticorp. De asemenea, ar trebui să se prepare o eprubetă NSB utilizând numai 600 μ l de soluție-tampon de analiză, și anume, niciun fără anticorp. Se acoperă eprubetele cu Parafilm și se agită ușor pentru amestecare. Se incubează într-o baie de apă la 37 °C timp de 1 oră.

Spălarea plăcii

Chiar înainte de finalizarea incubării primului anticorp, se spală placa. Aceasta se realizează

prin scuturare pentru eliminarea conținutului și tamponarea pe hârtie absorbantă pentru uscare. Godeurile sunt apoi umplute cu 350 μ l de soluție de spălare, șterse și uscate. Aici este utilă o pipetă cu mai multe canale cu picurare repetată sau un sistem de spălare a plăcii. Etapa de spălare se repetă de încă două ori, executându-se în total trei spălări.

Încărcarea plăcii

După spălarea plăcii, se îndepărtează eprubetele din baia de apă și se agită ușor. Se adaugă 200 μ l din fiecare eșantion, din soluția standard, B_0 și eprubeta NSB pentru a duplica godeurile plăcii. Se acoperă placa cu o peliculă de adeziv de etanșare și se lasă la incubat timp de o oră la 37 °C.

Incubația cu al doilea anticorp

La sfârșitul incubării din etapa anterioară, placa ar trebui să fie spălată din nou de trei ori, la fel ca mai sus. Se prepară al doilea anticorp diluat prin amestecarea a 2,5 μ l din al doilea anticorp cu 50 ml de soluție-tampon de analiză. Se adaugă 200 μ l din al doilea anticorp diluat în fiecare godeu, se etanșează ca mai sus și se incubează timp de 1 oră la 37 °C.

Adăugarea de substrat

După ce incubația cu al doilea anticorp s-a încheiat, se spală placa de trei ori, astfel cum s-a descris anterior. Apoi se adaugă 100 μ l de substrat TMB în fiecare godeu. Se lasă reacția timp de 10 minute pentru a se desfășura, de preferință, ferită de lumina puternică. Se oprește reacția prin adăugarea a 100 μ l de acid fosforic 1 M. Aceasta va determina schimbarea culorii din albastru în galben intens. Se măsoară absorbanta la 450 nm utilizând un cititor de placă.

Calcularea B/ B_0

Se scade valoarea medie a NSB din toate măsurătorile. Se calculează B/ B_0 pentru fiecare eșantion și soluție standard împărțind valoarea absorbantei (B) la absorbanta medie a eșantionului B_0 .

Se obține curba standard și se determină valorile necunoscute

Se generează o curbă standard cu ajutorul unui software de grafică pe calculator (de exemplu, SlidewriteTM sau Sigma Plot[®]) care va extrapola cantitatea din B/ B_0 a eșantionului pe baza B/ B_0 a standardelor. De regulă, cantitatea este reprezentată grafic pe o scară logaritmică și curba are o formă sigmoidă. Însă, este posibil să apară liniară atunci când se utilizează o gamă restrânsă de standarde. Se corectează cantitățile eșantionului pentru factorul de diluție, acestea fiind consemnate ca mg VTG/ml din plasmă.

Determinarea limitelor de detecție minime (MDL)

Adesea, în special la masculii normali, nu este clar cum să se raporteze rezultatele obținute pe baza valorilor mici. În aceste cazuri, ar trebui să se utilizeze „limitele de încredere” de

95 %, pentru a stabili dacă valoarea respectivă ar trebui consemnată ca fiind zero sau ca un alt număr. În cazul în care rezultatul eşantionului se încadrează în intervalul de încredere al standardului zero (B_0), rezultatul ar trebui consemnat ca fiind zero. Nivelul minim de detecție va fi cel mai scăzut standard care este în mod consecvent diferit de standardul zero; adică, cele două intervale de încredere nu se suprapun. Pentru orice rezultat al eşantionului care se încadrează în limita de încredere a nivelului minim de detectare, sau depășește această limită, se va consemna valoarea calculată. În cazul în care un eşantion se încadrează între standardul zero și intervalele minime de detecție, ar trebui să se consemneze o jumătate din nivelul minim de detecție pentru valoarea eşantionului respectiv.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

Apendicele 7

ANALIZA STATISTICĂ

LAGDA generează trei forme de date de analizat din punct de vedere statistic: (1) date continue cantitative, (2) date despre timpul până la evenimente pentru ratele de dezvoltare (timpul până la stadiul 62 din NF) și (3) date ordinale sub formă de punctaje de severitate sau stadii de dezvoltare obținute în urma evaluărilor histopatologice. Arborele decizional pentru analiza statistică recomandat pentru LAGDA este prezentat în figura 1. De asemenea, mai jos sunt indicate unele adnotări care ar putea fi necesare pentru a efectua analiza statistică pentru măsurătorile LAGDA. Pentru arborele decizional de analiză, ar trebui să se analizeze rezultatele măsurătorilor pentru mortalitate, creștere (greutate și lungime) și indicele somatic pentru ficat (LSI) în conformitate cu secțiunea „Alte puncte finale”.

Flux continuu de date

Datele pentru punctele finale continue ar trebui să fie mai întâi verificate în ceea ce privește monotonicitatea prin transformarea datelor prin clasificare, corelarea cu un model ANOVA și compararea contrastelor liniare și pătratice. În cazul în care datele sunt monotone, se efectuează un test al tendințelor cu regresie Jonckheere-Terpstra pe valorile medii ale replicilor și nu ar trebui să se mai aplice analize ulterioare. O alternativă pentru datele care sunt distribuite în mod normal cu variații omogene este testul cu regresie Williams. Dacă datele nu sunt monotone (contrastul pătratic este semnificativ și cel liniar nu este semnificativ), acestea ar trebui să fie analizate folosind un model ANOVA de efecte mixte. Ulterior, datele ar trebui să fie evaluate pentru normalitate (de preferat, folosind testul Shapiro-Wilk sau Anderson-Darling) și omogenitatea varianței (de preferință, folosind testul Levene). Ambele teste sunt efectuate pe valorile reziduale din modelul ANOVA de efecte mixte. Se poate recurge la opinia experților în locul acestor teste formale privind normalitatea și omogenitatea varianței, deși sunt preferate testele formale. În cazul în care datele sunt distribuite în mod normal cu o varianță omogenă, ipotezele unui efect mixt ANOVA se confirmă și se determină un efect semnificativ al tratamentului din testul lui Dunnett. În cazul în care se constată non-normalitatea sau caracterul eterogen al varianței, atunci se încalcă ipotezele testului lui Dunnett și se caută o transformare pentru normalizare și stabilizare a varianței. În cazul în care nu se constată o astfel de transformare, atunci se determină un efect semnificativ al tratamentului, cu un test al lui Dunn. Ori de câte ori este posibil, ar trebui să se efectueze un test unidirecțional, față de un test bidirecțional, însă se impune o apreciere profesională pentru a decide care este corespunzător pentru un anumit punct final.

Mortalitate

Datele privind mortalitatea ar trebui să fie analizate pentru perioada de timp care cuprinde întregul test și ar trebui să fie exprimate ca proporție care a murit într-un anumit bazin. Mormolocii care nu încheie procesul de metamorfoză în intervalul de timp dat, acei mormoloci care se află în sub-eșantionul de cohortă larvară, acei pești tineri care sunt

eliminați, precum și orice animal care moare din cauza unei erori a experimentatorului ar trebui să fie tratați ca date cenzurate și să nu fie incluși în numitorul calculului procentual. Înainte de orice analiză statistică, ar trebui ca proporția mortalității să fie transformată în arcsin-rădăcină pătrată. O alternativă este utilizarea testului Cochran-Armitage de regresie, eventual cu o ajustare Rao-Scott în prezența supradispersiei.

Greutatea și lungimea (date privind creșterea)

Masculii și femelele nu sunt dimorfe din punct de vedere sexual în timpul metamorfozei, astfel încât datele privind creșterea în sub-eșantionul larvar ar trebui să fie analizate independent de sex. Cu toate acestea, datele privind creșterea puietului ar trebui să fie analizate separat pe criterii de sex genetic. Pentru aceste puncte finale este posibil să fie nevoie de o transformare log, deoarece normalitatea log a datelor privind dimensiunile nu este un lucru neobișnuit.

Indicele somatic pentru ficat (LSI)

Greutățile ficatului ar trebui să fie normalizate ca proporții din greutatea totală ale corpului (și anume, LSI) și ar trebui să fie analizate separat pe baza sexului genetic.

Timp până la stadiul 62 din NF

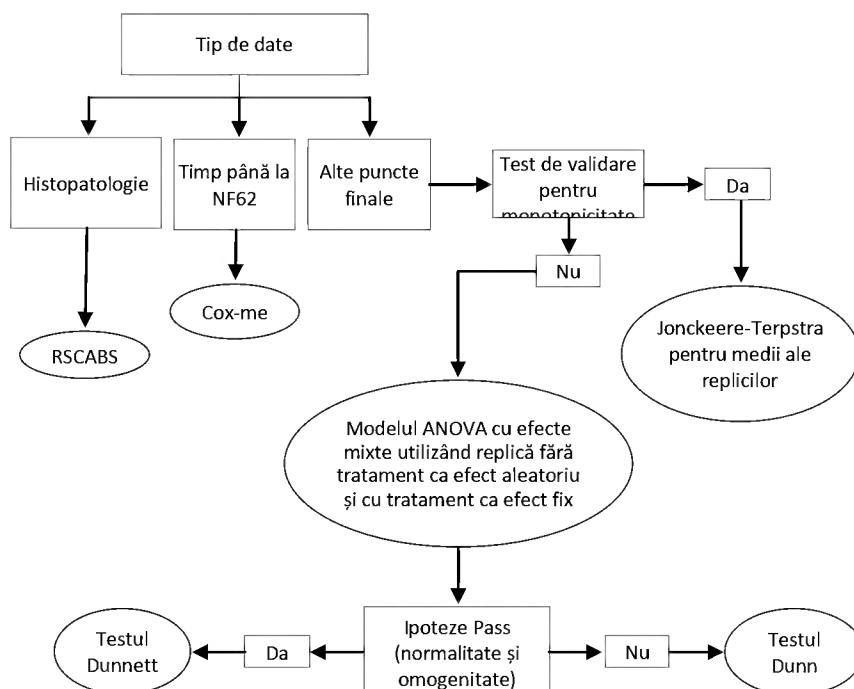
Datele privind timpul până la metamorfoză ar trebui să fie tratate ca date privind timpul până la eveniment, iar orice cazuri de mortalitate sau de exemplare care nu ajung în stadiul 62 NF în 70 de zile ar trebui tratate drept date cenzurate de drept (și anume, valoarea reală este mai mare de 70 de zile, dar studiul se încheie înainte ca animalele să fi atins stadiul 62 NF în 70 de zile). Timpul median până la încheierea stadiului 62 NF al metamorfozei la martorii din apa de diluție ar trebui să fie utilizat pentru stabilirea datei de încheiere a testului. Timpul mediu pentru încheierea metamorfozei ar putea fi determinat de factorii de estimare produs-limită Kaplan-Meier. Acest punct final ar trebui să fie analizat utilizând un model de risc proporțional cu efecte mixte Cox, care ține seama de structura replicată a studiului.

Date privind histopatologia (punctaje de severitate și stadii de dezvoltare)

Datele privind histopatologia sunt prezentate sub forma unor punctaje de severitate sau stadii de dezvoltare. Un test denumit RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) utilizează un test al tendințelor Cochran-Armitage cu Rao-Scott cu regresie ajustat la fiecare nivel de severitate în cadrul unui răspuns histopatologic (Green *et al.*, 2014). Ajustarea Rao-Scott integrează în test modelul experimental al recipientului replicat. Procedura „by Slices” integrează estimarea biologică conform căreia severitatea efectelor tinde să crească, odată cu creșterea dozelor sau a concentrațiilor, păstrând în același timp punctajele individuale și indicând severitatea oricărui efect identificat. Procedura RSCABS nu doar determină tratamentele care sunt diferite din punct de vedere statistic de martori (și anume, au o patologie mai severă decât martorii), ci determină, de asemenea, la ce punctaj de severitate apare diferența, oferind astfel un context atât de necesar pentru analiză. În cazul stabilirii

stadiilor de dezvoltare la gonade și canalele de reproducere, ar trebui să se aplice o manipulare suplimentară a datelor, întrucât una dintre ipotezele RSCABS este aceea că gradul de severitate crește odată cu doza. Efectul observat ar putea fi o întârziere sau o accelerare a dezvoltării. Prin urmare, datele privind stadiile de dezvoltare ar trebui să fie analizate, astfel cum au fost consemnate, pentru a detecta accelerarea procesului de dezvoltare și apoi a trece manual la o a doua analiză pentru a detecta o întârziere în dezvoltare.

Figura 1: Arborele decizional al analizei statistice pentru datele LAGDA.



REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1108-1116.

Apendicele 8

CONSIDERENTE PRIVIND URMĂRIREA ȘI MINIMIZAREA APARIȚIEI SCOLIOZEI

Scolioza idiopatică, ce se manifestă, de obicei, prin „coadă îndoită” la mormoloci *Xenopus laevis*, ar putea complica observațiile morfologice și comportamentale la populațiile testate. Ar trebui să se depună eforturi pentru a reduce la minimum sau a elimina incidența scoliozei, atât în stoc, cât și în condiții de testare. În cadrul testului final, se recomandă ca prevalența scoliozei moderate și severe să fie sub 10 %, pentru o mai bună încredere că testul poate detecta efecte la nivelul dezvoltării care sunt corelate cu tratamentul la larvelor amfibieni care sunt sănătoase în alte condiții.

Observațiile zilnice din timpul testului final ar trebui să înregistreze atât incidența (numărul individual), cât și severitatea scoliozei, în cazul în care acestea există. Natura anomaliilor ar trebui să fie descrisă cu referire la locație (de exemplu, anterior sau posterior față de cloacă) și direcția curburii (de exemplu, lateral sau dorsto-ventrală). Severitatea poate fi clasificată după cum urmează:

(NR) Nu este remarcabilă: nu există o curbă

(1) Minimă: ușoară, curbă laterală posterior față de cloacă; aparent doar în repaus

(2) Moderată: curbă laterală posterior față de cloacă; vizibilă în orice moment, dar nu împiedică deplasarea

(3) Severă: curbă laterală anterior față de cloacă; SAU orice curbă care inhibă deplasarea; SAU orice curbă dorsoventrală

Un comitet științific consultativ FIFRA al US EPA (FIFRA SAP 2013) a analizat datele sintetizate pentru scolioză în cadrul a cincisprezece analize privind metamorfoza la amfibii pe *X. laevis* (de la stadiul NF 51 până la 60+) și a prezentat recomandări generale pentru reducerea prevalenței acestei anomalii la populațiile de testare. Recomandările sunt relevante pentru LAGDA, chiar dacă acest test cuprinde un calendar de dezvoltare mai lung.

Performanța istorică privind depunerea icrelor

În general, ca perechi de reproducție ar trebui să fie utilizați adulții sănătoși și de înaltă calitate; eliminarea perechilor de reproducție care produc pui cu scolioză poate reduce la minim apariția acesteia în timp. În mod specific, ar putea fi benefică reducerea la minimum a utilizării stocului de reproducere cu exemplare capturate în sălbăticie. Perioada de expunere LAGDA începe cu stadiul NF cu 8-10 embrioni și nu este posibil să se determine încă de la începutul testului dacă anumite exemplare vor prezenta scolioză. Astfel, în afară de urmărirea incidenței scoliozei la animalele supuse testului, ar trebui să se documenteze performanța istorică privind seria de icre (inclusiv prevalența scoliozei la orice larve

permise să se dezvolte). Ar putea fi util să se monitorizeze în continuare porțiunea fiecărei serii de icre care nu sunt utilizate într-un anumit studiu și să se consemneze aceste observații (FIFRA SAP 2013).

Calitatea apei

Este important să se asigure o calitate adecvată a apei, atât în stocul din laborator, cât și în timpul testului. În plus față de criteriile privind calitatea apei, care sunt evaluate în mod curent pentru testele de toxicitate acvatică, poate fi util să se monitorizeze și să se corecteze orice deficiențe de nutrienți (de exemplu, deficiența de vitamina C, calciu, fosfor) sau nivelurile în exces de seleniu și de cupru, care sunt raportate a provoca scolioză în grade diferite la speciile crescute în laborator *Rana* sp. și *Xenopus* sp. (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; astfel cum au fost raportate în FIFRA 2013). Utilizarea unui regim alimentar adecvat (a se vedea apendicele 4) și curățarea periodică a bazinelor, vor îmbunătăți, în general, calitatea apei și sănătatea exemplarelor de testare.

Regimul alimentar

Recomandări specifice privind un regim alimentar, care se constată că au fost reușite în cazul LAGDA, sunt prezentate în detaliu în apendicele 4. Se recomandă ca sursele de hrană pentru animale să fie verificate pentru a detecta prezența toxinelor biologice, a erbicidelor și a altor pesticide despre care se știe că provoacă scolioză la *X. laevis* sau la alte animale acvatice (Schlenk și Jenkins 2013). Spre exemplu, expunerea la anumiți inhibitori ai colinesterazei a fost asociată cu scolioza la pești (Schultz *et al.* 1985) și broaște (Bacchetta *et al.* 2008).

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara și G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. *Science of the Total Environment* 392: 110-118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont și R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. *Toxicology* 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley și J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. *Journal of the World Aquaculture Society* 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski și D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraiez și P. Herraiez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezii* tadpoles. *Anatomical Records* 233(2): 314-320.

Schlenk, D. și Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. 21-23 mai 2013. Washington, DC. ”