

32000L0032

8.6.2000

JURNALUL OFICIAL AL COMUNITĂȚILOR EUROPENE

L 136/1

DIRECTIVA 2000/32/CE A COMISIEI**din 19 mai 2000****de efectuare a celei de-a douăzeci și șasea adaptări la progresul tehnic a Directivei 67/548/CEE a Consiliului privind apropierea actelor cu putere de lege și a actelor administrative cu privire la clasificarea, ambalarea și etichetarea substanțelor periculoase (*)****(Text cu relevanță pentru SEE)**

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Europene,

având în vedere Directiva 67/548/CEE a Consiliului din 27 iunie 1967 privind apropierea actelor cu putere de lege și a actelor administrative referitoare la clasificarea, ambalarea și etichetarea substanțelor periculoase (1), astfel cum a fost modificată ultima dată prin Directiva 1999/33/CE a Parlamentului European și a Consiliului (2) și, în special, articolul 28 al acesteia,

întrucât:

- (1) Anexa I la Directiva 67/548/CEE conține o listă de substanțe periculoase, precum și detalii privind clasificarea și etichetarea fiecărei substanțe. Cunoștințele tehnice și științifice actuale au demonstrat că lista de substanțe periculoase prevăzută în anexa menționată ar trebui adaptată. Anumite secțiuni din cuvântul introductiv și din tabelul A al anexei I la directivă necesită rectificări în anumite versiuni lingvistice.
- (2) Anexa III la Directiva 67/548/CEE conține o listă de fraze care indică natura riscurilor speciale atribuite substanțelor și preparatelor periculoase. Anexa IV la Directiva 67/548/CEE conține o listă de fraze care indică recomandări de prudență referitoare la substanțele și preparatele periculoase. Anexa VI la Directiva 67/548/CEE conține un ghid pentru clasificarea și etichetarea substanțelor și preparatelor periculoase. Anumite secțiuni din anexele III, IV și VI la directivă necesită rectificări în anumite versiuni lingvistice.
- (3) Anexa V la Directiva 67/548/CEE stabilește metodele de determinare a proprietăților fizico-chimice, toxicității și ecotoxicității substanțelor și preparatelor. Această anexă trebuie adaptată la progresul tehnic.
- (4) Anexa IX la Directiva 67/548/CEE conține dispoziții referitoare la sistemele de închidere de siguranță pentru

copii. Aceste dispoziții ar trebui adaptate și actualizate. Este necesar să se extindă domeniul de aplicare al utilizării sistemelor de închidere de siguranță pentru copii.

- (5) Măsurile prevăzute în prezenta directivă sunt conforme cu avizul Comitetului pentru adaptarea la progresul tehnic a directivelor privind eliminarea barierelor tehnice din calea comerțului cu substanțe și preparate periculoase,

ADOPTĂ PREZENTA DIRECTIVĂ:

Articolul 1

Directiva 67/548/CEE se modifică după cum urmează:

1. Anexa I se modifică după cum urmează:
 - (a) Nota Q din anexa 1A la prezenta directivă înlocuiește nota corespunzătoare din cuvântul introductiv.
 - (b) Rândurile din anexa 1B la prezenta directivă înlocuiesc rândurile corespunzătoare din tabelul A.
 - (c) Intrările din anexa 1C la prezenta directivă înlocuiesc intrările corespunzătoare.
 - (d) Se adaugă intrările din anexa 1D la prezenta directivă.
2. Fraza de risc din anexa 2 la prezenta directivă înlocuiește fraza corespunzătoare din anexa III.
3. Anexa IV se modifică după cum urmează:
 - (a) Frazele de prudență din anexa 3A la prezenta directivă înlocuiesc frazele corespunzătoare din anexa IV.

(*) Adoptată după cea de-a douăzeci și șaptea adaptare.

(1) JO 196, 16.8.1967, p. 1.

(2) JO L 199, 30.7.1999, p. 57.

- (b) Frazele de prudență combinate din anexa 3B la prezenta directivă înlocuiesc frazele corespunzătoare din anexa IV.
4. Partea B din anexa V se modifică după cum urmează:
- (a) Textul din anexa 4A la prezenta directivă înlocuiește capitolul B.10.
- (b) Textul din anexa 4B la prezenta directivă înlocuiește capitolul B.11.
- (c) Textul din anexa 4C la prezenta directivă înlocuiește capitolul B.12.
- (d) Textul din anexa 4D la prezenta directivă înlocuiește capitolele B.13 și B.14.
- (e) Textul din anexa 4E la prezenta directivă înlocuiește capitolul B.17.
- (f) Textul din anexa 4F la prezenta directivă înlocuiește capitolul B.23. Titlul capitolului B.23 din nota explicativă se modifică în consecință.
- (g) Se adaugă textul din anexa 4G la prezenta directivă.
5. A patra liniuță din introducerea generală la partea C a anexei V se elimină.
6. Textele din anexa 5 la prezenta directivă înlocuiesc textele corespunzătoare din anexa VI.
7. Anexa IX se modifică în conformitate cu anexa 6 la prezenta directivă.

Articolul 2

(1) Statele membre adoptă și pun în aplicare actele cu putere de lege și actele administrative necesare pentru a se conforma prezentei directive până la 1 iunie 2001. Statele membre informează de îndată Comisia cu privire la aceasta.

Atunci când statele membre adoptă aceste acte, ele cuprind o trimitere la prezenta directivă sau sunt însoțite de o asemenea trimitere la data publicării lor oficiale. Statele membre stabilesc modalitatea de efectuare a acestei trimiteri.

(2) Comisiei îi sunt comunicate de către statele membre principalele dispoziții de drept intern pe care le adoptă în domeniul reglementat de prezenta directivă, precum și un tabel de corespondență între prezenta directivă și dispozițiile interne adoptate.

Articolul 3

Prezenta directivă intră în vigoare în a treia zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Comunităților Europene*.

Articolul 4

Prezenta directivă se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles, 19 mai 2000.

Pentru Comisie

Margot WALLSTRÖM

Membru al Comisiei

ANEXA 1A

CUVÂNT INTRODUCȚIV LA ANEXA I

A se vedea Directiva 2001/59/CE a Comisiei (JO L 225, 21.8.2001, p. 1).

ANEXA 1B
„TABEL A

Z	Simbol	ES	DA	DE	EL	EN	FI	FR	IT	NL	PT	SV
18	Ar	Argón	Argon	Argon	Αργό	Argon	Argon	Argon	Argon	Argon	Árgon	Argon
64	Gd	Gadolínio	Gadolínium	Gadolínium	Γαδολίνιο	Gadolínium	Gadolínium	Gadolínium	Gadolínio	Gadolínium	Gadolínio	Gadolínium*

ANEXA 1C

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
006-011-00-7	carbaryl (ISO) 1-naftilmetilcarbamat		200-555-0	63-25-2	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50	Xn; N R: 22-40-50 S: (2-)22-24-36/37-46-61		
006-013-00-8	metam-sodium (ISO) metilditiocarbamat de sodiu		205-293-0	137-42-8	Xn; R22 R31 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-31-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
006-015-00-9	diuron (ISO) 3-(3,4-diclorfenil)-1,1-dimetiluree		206-354-4	330-54-1	Carc. Cat. 3; R40 Muta. Cat. 3; R40 Xn; R22-48/22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-48/22-50/53 S: (2-)13-22-23-37-46-60-61		
006-016-00-4	propoxur (ISO) N-metilcarbamat de 2-isopropiloxifenilmetilcarbamat de 2-isopropoxifenil		204-043-8	114-26-1	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
006-017-00-X	aldicarb (ISO) 2-metil-2-(metil)propanal-O-(N- metilcarbamoi)oximă		204-123-2	116-06-3	T+; R26/28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-018-00-5	aminocarb (ISO) 4-dimetilamino-3-tolil metilcarbamat		217-990-7	2032-59-9	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
006-019-00-0	di-allate (ISO) S-(2,3-diclorail)-N,N-diisopropiltiocarbamat		218-961-1	2303-16-4	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)25-36/37-60-61		
006-020-00-6	barban (ISO) 4 - clorbut-2-inil N-(3 -clorfenil)carbamat		202-930-4	101-27-9	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-36/37-60-61		
006-023-00-2	mercaptodimetur (ISO) metiocarb; 3,5-dimetil-4-metiltiofenil N-metilcarbamat		217-991-2	2032-65-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)22-37-45-60-61		
006-024-00-8	proxan-sodium (ISO) O-izopropilditiocarbamat de sodiu		205-443-5	140-93-2	Xn; R22 Xi; R38 N; R51-53	Xn; N R: 22-38-51/53 S: (2-)13-61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
006-026-00-9	carbofuran (ISO) 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuranil-7-N-metilcarbammat		216-353-0	1563-66-2	T+; R26/28 N; R50-53	T+; N R: 26/28-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
006-028-00-X	dinobuton (ISO) 2-(1-metilpropil)-4,6-dinitrofenil izopropil carbonat		213-546-1	973-21-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
006-029-00-5	dioxacarb (ISO) 2-(1,3-dioxolanil-2)fenil N-metilcarbammat		230-253-4	6988-21-2	T; R25 N; R51-53	T; N R: 25-51/53 S: (1/2-)37-45-61		
006-033-00-7	metoxuron (ISO) 3-(3-clor-4-metoxifenil)-1,1-dimetiluree		243-433-2	19937-59-8	N R: 50/53 S: 60-61	N R: 50/53 S: 60-61		
006-034-00-2	pebulate (ISO) N-butil-N-etil-S-propiltiocarbamat		214-215-4	1114-71-2	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)23-61		
006-035-00-8	pirimicarb (ISO) 5,6-dimetil-2-dimetilamino-pirimidin-4-il N,N-dimetilcarbammat		245-430-1	23103-98-2	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2)22-37-45-60-61		
006-037-00-9	promecarb (ISO) 3-isopropil-5-metilfenil N-metilcarbammat		220-113-0	2631-37-0	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)24-37-45-60-61		
006-038-00-4	sulfallate (ISO) 2-clorail N,N-dimetilditocarbamat	E	202-388-9	95-06-7	Carc. Cat. 2; R45 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61		
006-039-00-X	tri-allate (ISO) S-2,3,3-triclorail diizopropiltiocarbamat		218-962-7	2303-17-5	Xn; R22-48/22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-48/22-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
006-042-00-6	monuron (ISO) 3-(4-clorfenil)-1,1-dimetiluree		205-766-1	150-68-5	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
006-043-00-1	monuron-TCA 3-(4-clorfenil)-1,1-dimetiluroniu tricloracetat		—	140-41-0	Xi; R36/38 Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 36/38-40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
006-045-00-2	methomyl (ISO) 1-(metilfio)etilidenamino N-metilcarbammat		240-815-0	16752-77-5	T+; R28 N; R50-53	T+; N R: 28-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-046-00-8	bendiocarb (ISO) N-metilcarbammat de 2,2-dimetil-1,3-benzodioxolil-4		245-216-8	22781-23-3	T; R23/25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-047-00-3	bufencarb (ISO) amestec de 3-(1-metilbutil)fenil N-metilcarbammat și 3-(1-etilpropil)fenil N-metilcarbammat		—	8065-36-9	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
006-048-00-9	ethiofencarb (ISO) N-metilcarbammat de 2-(etilfio)metil)fenil		249-981-9	29973-13-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
006-050-00-X	fenuron-TCA tricloracetat de 1,1-dimetil-3-feniluroniu		—	4482-55-7	Xi; R38 N; R50-53	Xi; N R: 38-50/53 S: (2-)60-61		
006-053-00-6	isoprocarb (ISO) 2-izopropilfenil N-metilcarbammat		220-114-6	2631-40-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
006-054-00-1	mexacarbate (ISO) 3,5-dimetil-4-dimetilaminofenil N-metilcarbammat		206-249-3	315-18-4	T+; R28 Xn; R21 N; R50-53	T+; N R: 21-28-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
006-057-00-8	nitrapyrin (ISO) 2-clor-6-triclorometilpiridină		217-682-2	1929-82-4	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)24-61		
006-060-00-4	oxycarboxin (ISO) 2,3-dihidro-6-metil-5-(N-fenilcarbamoi)-1,4-oxitiazin 4,4-dioxid		226-066-2	5259-88-1	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)61		
006-069-00-3	thiophanate-methyl (ISO) 1,2-di-(3-metoxicarbomil-2-tioureido)benzen		245-740-7	23564-05-8	Muta. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
006-070-00-9	furmecyclox N-ciclohexil-N-metoxi-2,5-dimetil-3-furamidă		262-302-0	60568-05-0	Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
006-088-00-7	benfurcarb (ISO) etil N-[2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7- iloxicarbonil(metil)amino]N-izopropil-b- alaninat		—	82560-54-1	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
007-012-00-5	N,N-dimetilhidrazină 1,1-dimetilhidrazină	E	200-316-0	57-14-7	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/25 C; R34 N; R51-53	F; T; N R: 45-11-23/25-34-51/53 S: 53-45-61		
007-013-00-0	N,N'-dimetilhidrazină 1,1-dimetilhidrazină	E	—	540-73-8	Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 25 %; T; R45- 23/24/25 3 % ≤ C < 25 %; T; R45- 20/21/22 0,01 % ≤ C < 3 %; T; R45	
009-003-00-1	acid fluorhidric... %	B	231-634-8	7664-39-3	T+; R26/27/28 C; R35	T+; C R: 26/27/28-35 S: (1/2-)7/9-26-36/37-45	C ≥ 7 %; T+; C; R26/27/28-35 1 % ≤ C < 7 %; T; R23/24/25-34 0,1 % ≤ C < 1 %; Xn; R20/21/22-36/37/38	
015-039-00-9	azinfos-methyl (ISO) O,O-dimetil 4-oxobenzotriazin-3-il-metil fosforoditoat		201-676-1	86-50-0	T+; R26/28 T; R24 R43 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-43-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
015-048-00-8	fenthion (ISO) O,O-dimetil-O-(4-metilition-m-tolil) fosforotioat		200-231-9	55-38-9	Muta. Cat. 3; R40 T; R23-48/25 Xn; R21/22 N; R50-53	T; N R: 21/22-23-40-48/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
015-056-00-1	azinfos-ethyl (ISO) O,O-dietil 4-oxobenzotriazin-3-il-metil fosforoditoat		220-147-6	2642-71-9	T+; R28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-28-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
015-140-00-8	triazophos (ISO) O,O-dietil-O-1-fenil-1H,2,4-triazolil-3 fosforotioat		245-986-5	24017-47-8	T; R23/25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
016-013-00-X	diclorură de sulf		234-129-0	10545-99-0	R14 C; R34 N; R50	C; N R: 14-34-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 10 %; C; R34 5 % ≤ C < 10 %; Xi; R36/37/38	

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
016-014-00-5	tetraclorură de sulf		—	13451-08-6	R14 C: R34 N: R50	C: N R: 14-34-50 S: (1/2)/26-36/37/39-45-61	C ≥ 10 %; C: R34 5 % ≤ C < 10 %; Xi; R36/37/38	
016-023-00-4	dimetil sulfat	E	201-058-1	77-78-1	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T+; R26 T; R25 C: R34 R43	T+ R: 45-25-26-34-43 S: 53-45	C ≥ 25 %; T+; R45-25-26-34-43 10 % ≤ C < 25 %; T+; R45-22-26-34-43 7 % ≤ C < 10 %; T+; R45-22-26-36/37/38-43 5 % ≤ C < 7 %; T; R45-22-23-36/37/38-43 3 % ≤ C < 5 %; T; R45-22-23-43 1 % ≤ C < 3 %; T; R45-23-43 0.1 % ≤ C < 1 %; T; R45-20 0.01 % ≤ C < 0.1 %; T; R45	
016-024-00-X	dimexano (ISO) bimetoxitocarbonil) disulfură		215-993-8	1468-37-7	Xn: R22 N: R50-53	Xn: N R: 22-50/53 S: (2)/60-61		
016-071-00-6	3-amino-6,1,3-diclor-10-[(3-[(4-clor-6-(2-sulfenilamino)-1,3,5-triazinil-2-amino)propil]amino)-4,1,1-trifenoxidioxazindisulfonat trisodic		410-130-3	136248-03-8	R43	Xi R: 43 S: (2)/22-24-37		
022-001-00-5	tetraclorură de titan		231-441-9	7550-45-0	R14 C: R34	C R: 14-34 S: (1/2)/7/8-26-36/37/39-45	C ≥ 10 %; C: R34 5 % ≤ C < 10 %; Xi; R36/37/38	
030-004-00-8	dimetilzinc [1] dietilzinc [2]		208-884-1 [1] 209-161-3 [2]	544-97-8 [1] 557-20-0 [2]	R14 F: R17 C: R34 N: R50-53	F; C: N R: 14-17-34-50/53 S: (1/2)/16-43-45-60-61		
050-002-00-0	cyhexatin (ISO) hidroxitriciclohexilstranan; hidroxid de tri(ciclohexil)staniu		236-049-1	13121-70-5	Xn: R20/21/22 N: R50-53	Xn: N R: 20/21/22-50/53 S: (2)/13-60-61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
050-012-00-5	tetraclohexilstanan [1] chlortrichlohexilstanan [2] butiltrichlohexilstanan [3]		215-910-5 [1] 221-437-5 [2] 230-358-5 [3]	1449-55-4 [1] 3091-32-5 [2] 7067-44-9 [3]	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)26-28-60-61 C ≥ 1 %; Xn; R20/21/22	1	
050-017-00-2	fenbutatin oxide (ISO) bi(tri(2-metil-2-fenilpropil)staniu)oxid		236-407-7	13356-08-6	T+; R26 Xi; R36/38 N; R50/53	T+; N R: 26-36/38-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
082-009-00-X	sulfocromat galben de plumb; pigment galben 34 C.I. [Această substanță este identificată în indexul de culori prin numărul de constituire din indexul de culori, C.I. 77603.]		215-693-7	1344-37-2	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 R33 N; R50-53	T; N R: 61-33-40-50/53-62 S: 53-45-60-61		1
082-010-00-5	chromat, molidat sulfat roșu de plumb; pigment roșu 104 C.I. [Această substanță este identificată în Indexul de culori prin Numărul de constituire din Indexul de culori C.I. 77605.]		235-759-9	12656-85-8	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 R33 N; R50-53	T; N R: 61-33-40-50/53-62 S: 53-45-60-61		1
601-024-00-X	cumen [1] propilbenzen [2]		202-704-5 [1] 203-132-9 [2]	98-82-8 [1] 103-65-1 [2]	R10 Xn; R65 Xi; R37 N; R51-53	Xn; N R: 10-37-51/53-65 S: (2-)24-37-61-62		4
601-032-00-3	benzo[<i>a</i>]piren benzo[<i>d</i>]crisenă		200-028-5	50-32-8	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 N; R50-53	T; N R: 45-46-60-61-50/53 S: 53-45-60-61		
601-034-00-4	benz[<i>e</i>]acefenantrilen		205-911-9	205-99-2	Carc. Cat. 2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
602-035-00-2	1,4-diclorbenzen <i>p</i> -diclorbenzen		203-400-5	106-46-7	Xi; R36 N; R50-53	Xi; N R: 36-50/53 S: (2-)24/25-46-60-61		
602-054-00-6	3-iodpropenă iodură de alil		209-130-4	556-56-9	R10 C; R34	C R: 10-34 S: (1/2-)7-26-45		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
603-076-00-9	2-butenă-1,4-diol 2-butin-1,4-diol		203-788-6	110-65-6	T; R23/25 Xn; R21-48/22 C; R34	T R: 21-23/25-34-48/22 S: (1/2-)26-36/37/39-45	C ≥ 50 %; T; R21-23/25-34-48/22 25 % ≤ C < 50 %; T; R21-23/25-36/38-48/22 10 % ≤ C < 25 %; Xn; R20/22-48/22 3 % ≤ C < 10 %; Xn; R20/22	
603-091-00-0	exo-1-metil-4-(1-metiletil)-7-oxabicyclo[2.2.1]heptan-2		402-470-6	87172-89-2	O; R8 Xn; R22 Xi; R36	O; Xn R: 8-22-36 S: (2-)26		
603-093-00-1	exo-(+/-)-1-metil-4-(1-metiletil)-2-[(2-metilfenil)metoxi]-7-oxabicyclo[2.2.1]heptan		402-410-9	87818-31-3	Xn; R20 N; R51-53	Xn; N R: 20-51/53 S: (2-)23-61		
603-097-00-3	1,1',1''-nitritripropanol-2; triizopropanolamină		204-528-4	122-20-3	Xi; R36 R52-53	Xi R: 36-52/53 S: (2-)26-61		
603-117-00-0	2-propanol alcool izopropilic izopropanol		200-661-7	67-63-0	F; R11 Xi; R36 R67	F; Xi R: 11-36-67 S: (2-)7-16-24/25-26		6
604-020-00-6	2-bifenilol 2-hidroxbifenil 2-phenylphenol (ISO)		201-993-5	90-43-7	Xi; R36/37/38 N; R50	Xi; N R: 36/37/38-50 S: (2-)22-61		
604-021-00-1	sare de sodiu 2-fenilfenol 2-bifenilat de sodiu		205-055-6	132-27-4	Xn; R22 Xi; R37/38-41 N; R50	Xn; N R: 37/38-41-50 S: (2-)22-26-61		
604-024-00-8	4,4'-izobutiletididifenol (alt.); 2,2-bi(4'-hidroxifenil)-4-metilpentan		401-720-1	6807-17-6	Repr. Cat. 2; R60 Xi; R36 N; R50-53	T; N R: 60-36-50/53 S: 53-45-60-61		
604-041-00-0	acfluorfen [1] acfluorfen-sodiu [2] acid 5-[2-clor-4-(trifluorometil)fenoxi]-2-nitrobenzoic [1] 5-[2-clor-4-(trifluorometil)fenoxi]-2-nitrobenzoat de sodiu [2]		256-634-5 [1] 263-560-7 [2]	50594-66-6 [1] 62476-59-9 [2]	Xn; R22 Xi; R38-41 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-41-50/53 S: (2-)24-39-60-61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
604-043-00-1	monobenzenă 4-hidroxiifenil benzil eter eterul monobenzenilic al hidrochinonei		203-083-3	103-16-2	Xi; R36 R43	Xi R: 36-43 S: (2-)24/25-26-37		
604-044-00-7	mecholino 4-metoxifenol eterul monometilic al hidrochinonei		205-769-8	150-76-5	Xn; R22 Xi; R36 R43	Xn R: 22-36-43 S: (2-)24/25-26-37/39-46		
605-016-00-7	glioaxal... % etandial... %	B	203-474-9	107-22-2	Muta. Cat. 3; R40 Xn; R20 Xi; R36/38 R43	Xn R: 20-36/38-40-43 S: (2-)36/37	C ≥ 10 %: Xn; R20-36/38-40-43 1 % ≤ C < 10 %: Xn; R40-43	
606-016-00-X	pindone (ISO) 2-pivaloilindan dionă 1,3		201-462-8	83-26-1	T; R25-48/25 N; R50-53	T; N R: 25-48/25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
606-018-00-0	dichlone (ISO) 2,3-diclor-1,4-naftochinonă		204-210-5	117-80-6	Xn; R22 Xi; R36/38 N; R50-53	Xn; N R: 22-36/38-50/53 S: (2-)26-60-61		
606-019-00-6	chlordecone (ISO) percloropentaciclo[5,3,0,0 ^{2,6} ,0 ^{3,9} ,0 ^{4,8}] decanonă-5 decacloropentaciclo[5,2,1,0 ^{2,6} ,0 ^{3,9} ,0 ^{5,8}] decanonă-4		205-601-3	143-50-0	Carc. Cat. 3; R40 T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-40-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
606-034-00-8	metribuzin (ISO) 4-amino-6-terț-butil-3-metilio-1,2,4- triazinonă-5(4H); 4-amino-4,5-dihidro-6-(1,1-dimetiletil)-3- metilio-1,2,4-triazinonă-5		244-209-7	21087-64-9	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
606-035-00-3	cloridazon (ISO) 5-amino-4-clor-2-fenilpiridazinonă-3-(2H) pirazon		216-920-2	1698-60-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
606-036-00-9	quinomethionate chinomethionat (ISO); 6-metil-1,3-ditiolo(4,5-b)chinoxalinonă-2		219-455-3	2439-01-2	Repr. Cat. 3; R62 Xn; R20/21/22-48/22 Xi; R36 R43 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-36-43-48/22-50/53-62 S: (2-)24-37-60-61		
606-037-00-4	triadimefon (ISO) 1-(4-clorfenoxi)-3,3-dimetil-1-(1,2,4-triazolil-1)butanonă		256-103-8	43121-43-3	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
606-044-00-2	2,4,6-trimetilbenzofenonă		403-150-9	954-16-5	Xn; R22 Xi; R36 N; R50-53	Xn; N R: 22-36-50/53 S: (2-)26-60-61		
607-043-00-X	dicamba (ISO) acid 2,5-diclor-6-metoxibenzoic acid 3,6-diclor-2-metoxibenzoic		217-635-6	1918-00-9	Xn; R22 Xi; R41 R52-53	Xn; N R: 22-41-52/53 S: (2-)26-61		
607-057-00-6	coumachlor (ISO) 3-[1-(4-clorfenil)-3-oxobutil]-4- hidroxicumarină		201-378-1	81-82-3	Xn; R48/22 R52-53	Xn R: 48/22-52/53 S: (2-)37-61		
607-058-00-1	cumafuryl (ISO) fumarin (RS)-3-(1-(2-furil)-3-oxobutil)-4- hidroxicumarină 4-hidroxi-3-[3-oxo-1-(2-furil)butil]cumarină		204-195-5	117-52-2	T; R25-48/25 R52-53	T R: 25-48/25-52/53 S: (1/2-)37-45-61		
607-079-00-6	kelevan (ISO) etil 5-(perclor-5- hidroxipentacilo[5,3,0 ^{2,6} ,0 ^{3,9} ,0 ^{4,8}] decanil-5)-4-oxopentanoat etil 5-(1,2,3,5,6,7,8,9,10,10-decator-4- hidroxipentacilo[5,2,1,0 ^{2,6} ,0 ^{3,9} ,0 ^{5,8}])decil-4)- 4-oxovalerianat		—	4234-79-1	T; R24 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 22-24-51/53 S: (1/2-)36/37-45-61		
607-097-00-4	1,2-anhidrida acidului benzen-1,2,4- tricarboxilic anhidridă trimelitică		209-008-0	552-30-7	Xi; R37-41 R42/43	Xn R: 37-41-42/43 S: (2-)22-26-36/37/39		
607-143-00-3	acid valeric		203-677-2	109-52-4	C; R34 R52-53	C R: 34-52/53 S: (1/2-)26-36-45-61		
607-152-00-2	2,3,6-TBA (ISO) acid 2,3,6-triclorbenzoic		200-026-4	50-31-7	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		
607-153-00-8	benazolin (ISO) acid 4-clor-2,3-dihidro-2-oxo-1,3- benzotiazol-3-il acetic		223-297-0	3813-05-6	Xi; R36/38 R52-53	Xi R: 36/38-52/53 S: (2-)22-61		
607-156-00-4	chlorfenson (ISO) 4-chlorfenil 4-clorbenzensulfonat		201-270-4	80-33-1	Xn; R22 Xi; R38 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-50/53 S: (2-)37-60-61		
607-158-00-5	sare de sodiu a acidului cloracetic cloracetat de sodiu		223-498-3	3926-62-3	T; R25 Xi; R38 N; R50	T; N R: 25-38-50 S: (1/2-)22-37-45-61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
607-159-00-0	chlorobenzilate (ISO) etil 2,2-di(4-chlorfenil)-2-hidroxiacetat etil 4,4'-diclorbenzilat		208-110-2	510-15-6	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
607-176-00-3	Amestec de: a-3-(3-(2H-benzotriazolil-2)-5-terț-butil-4-hidroxi)propionil-w-hidroxipoli(oxietilen); a-3-(3-(2H-benzotriazolil-2)-5-terț-butil-4-hidroxi)propionil-w-3-(3-(2H-benzotriazolil-2)-5-terț-butil-4-hidroxi)propioniloxipoli(oxietilenă)		400-830-7	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)36/37-61		
607-188-00-9	N-carboxilatoetil-N-octadec-9-enilmaleamat acid de sodiu		402-970-4	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24/37-61		
607-209-00-1	Amestec de: O, O-di(1-metiletil)tritio-bi-tioformiat; O, O-di(1-metiletil)tetratio-bi-tioformiat; O, O-di(1-metiletil)pentatio-bi-tioformiat		403-030-6	—	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
607-213-00-3	3,3-bi [(1,1-dimetilpropil)peroxi] butirat de etil		403-320-2	67567-23-1	E; R2 O; R7 R10 N; R51-53	E; N R: 2-7-10-51/53 S: (2-)3/7-14-33-36/37/39-61		
607-217-00-5	2-etoxietil 2-(4-(2,6-dihidro-2,6-dioxo-7-fenil-1,5-dioxaindacenil-3) fenoxi)acetat		403-960-2	—	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61		
607-243-00-7	3,6-diclor-o-anisat de sodiu [1]; acid 3,6-diclor-o-anisic, compus cu 2,2'-iminodietanol (1:1) [2]; acid 3,6-diclor-o-anisic, compus cu 2-aminoetanol (1:1) [3]	217-846-3 [1] 246-590-5 [2] 258-527-9 [3]	1982-69-0 [1] 25059-78-3 [2] 53404-28-7 [3]	R52-53	R: 52/53 S: 61			
607-248-00-4	naptalam-sodium N-napft-1-ilfhalamat de sodiu		205-073-4	132-67-2	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2)		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
607-249-00-X	(1-metil-1,2-etandil)bi [oxi(metil-2,1-etandil)] diacrilat tripropilen glicol diacrilat TPGDA		256-032-2	42978-66-5	Xi; R36/37/38 R43 N; R51-53	Xi; N R: 36/37/38-43-51/53 S: (2-)24-37-61	C ≥ 10 %; Xi; R36/37/38-43 1 % ≤ C < 10 %; Xi; R43	
607-252-00-6	lambda-cyhalothrin (ISO) amestec 1:1 de (S)-a-ciano-3-fenoxibenzil (Z)-(1R)-cis-3-(2-clor-3,3,3-trifluorpropenil)- 2,2-dimetilciclopropancarboxilat și (R)-a- ciano-3-fenoxibenzil (Z)-(1S)-cis-3-(2-clor- 3,3,3-trifluorpropenil)-2,2- dimetilciclopropancarboxilat		415-130-7	91465-08-6	T+; R26 T; R25 Xn; R21 N; R50-53	T+; N R: 21-25-26-50/53 S: (1/2-) 28-36/37/39-38-45-60-61		
607-255-00-2	fluroxypyr (ISO) acid 4-amino-3,5-diclor-6-fluor-2- piridiloxiacetic		—	69377-81-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
608-003-00-4	acrilonitril	D E	203-466-5	107-13-1	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 Xi; R37/38-41 R43 N; R51-53	F; T; N R: 45-11-23-/ 24/25-37/38-41-43-51/53 S: 9-16-53-45-61	C ≥ 20 %; T; R45- 23/24/25-37/38-41-43 10 % ≤ C < 20 %; T; R45-23/24/25-41-43 5 % ≤ C < 10 %; T; R45- 23/24/25-36-43 1 % ≤ C < 5 %; T; R45- 23/24/25-43 0,2 % ≤ C < 1 %; T; R45- 20/21/22 0,1 % ≤ C < 0,2 %; T; R45	
608-016-00-5	1,4-Diciano-2,3,5,6-tetra-clor-benzen		401-550-8	1897-41-2	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
609-030-00-4	dinoterb (ISO) 2-terț-butil-4,6-dinitrofenol	E	215-813-8	1420-07-1	Repr. Cat. 2; R61 T+; R28 T; R24 R44 N; R50-53	T+; N R: 61-24-28-44-50/53 S: 53-45-60-61		
609-040-00-9	nitrofen (ISO) 2,4-diclorfenil 4-nitrofenil eter	E	217-406-0	1836-75-5	Carc. Cat. 2; R45 Repr. Cat. 2; R61 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-61-22-50/53 S: 53-45-60-61		
609-044-00-0	tecnazene (ISO); 1,2,4,5-tetraclor-3-nitrobenzen		204-178-2	117-18-0	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
611-008-00-4	4-aminoazobenzen 4-fenilazoanilină		200-453-6	60-09-3	Carc. Cat. 2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
611-013-00-1	1-hidroxi-7-(3-sulfonatoanilino)-2-(3-metil-4-(2-metoxi-4-(3-sulfonofenilazo)fenilazo)fenilazo)naftalen-3-sulfonat de trilitiu		403-650-7	117409-78-6	E; R2 N; R51-53	E; N R: 2-51/53 S: (2-)35-61		
611-031-00-X	clorhidrat de 4,4'-(4-iminociclohexa-2,5-dienilidenmetilen)dianilină C.I. Roșu 9		209-321-2	569-61-9	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
612-035-00-4	2-metoxianilină o-anisidină	E	201-963-1	90-04-0	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T; R23/24/25	T R: 45-23/24/25 S: 53-45		
612-042-00-2	benzidină 1,1'-bifenil-4,4'-diamină 4,4'-diaminobifenil bifenil-4,4'-ilendiamină	E	202-199-1	92-87-5	Carc. Cat. 1; R45 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %; T; R45-22 0,01 % ≤ C < 25 %; T; R45	
612-051-00-1	4,4'-diaminodifenilmetan 4,4'-metilendianilină	E	202-974-4	101-77-9	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T; R39/23/24/25 Xn; R48/20/21/22 R43 N; R51-53	T; N R: 45-39/23/24/25-43-48/ 20/21/22-51/53 S: 53-45-61		
612-081-00-5	săruri de 4,4'-bi-o-toluidin săruri de 3,3'-dimetilbenzidină săruri de o-toluidin	A E	210-322-5 265-294-7 277-985-0	612-82-8 64969-36-4 74753-18-7	Carc. Cat. 2; R45 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 45-22-51/53 S: 53-45-61		
612-099-00-3	4-metil-m-fenilendiamină 2,4-toluendiamină	E	202-453-1	95-80-7	Carc. Cat. 2; R45 T; R25 Xn; R21 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 45-21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
612-105-00-4	2-piperazin-1-ylethylamine		205-411-0	140-31-8	Xn, R21/22 C; R34 R43 R52-53	C R: 21/22-34-43-52/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
612-111-00-7	2-metil-m-fenilendiamină 2,6-toluenediamină		212-513-9	823-40-5	Muta. Cat. 3; R40 Xn; R21/22 R43 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-40-43-51/53 S: (2-)24-36/37-61		
612-125-00-3	2-metil-p-fenilendiamină 2,5-toluediamină		202-442-1	95-70-5	T; R25 Xn; R20/21 R43 N; R51-53	T; N R: 20/21-25-43-51/53 S: (1/2-)24-37-45-61		
612-144-00-7	flumetralin (ISO) N-(2-clor-6-fluorbenzil)-N-etil-a.a.-trifluor- 2,6-dinitro-p-toluidină		—	62924-70-3	Xi; R36/38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 36/38-43-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
612-151-00-5	diaminotoluen	E	246-910-3	25376-45-8	Carc. Cat. 2; R45 T; R25 Xn; R20/21 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 45-20/21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
613-018-00-4	morfamquat (ISO) 1,1'-bi(3,5-dimetilmorfolinocarbonilmetil)- 4,4'-bipiridilium ion		—	7411-47-4	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52-53	Xn R: 22-36/37/38-52/53 S: (2-)22-36-61		
613-031-00-5	simclosen acid triclozocianuric tricolor-1,3,5-triazintron		201-782-8	87-90-1	O; R8 Xn; R22 R31 Xi; R36/37 N; R50-53	O; Xn; N R: 8-22-31-36/37-50/53 S: (2-)8-26-41-60-61		
613-038-00-3	6-fenil-1,3,5-triazin-2,4-dilidiamină 6-fenil-1,3,5-triazin-2,4-diainină benzoganamină		202-095-6	91-76-9	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)61		
613-042-00-5	imazalil (ISO) 1-[2-(aliloxi)-2-(2,4-diclorfenil)etil]-1H- imidazol		252-615-0	35554-44-0	Xn; R20/22 N; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
613-043-00-0	imazalil sulfat (ISO) sulfat acid de 1-[2-(aliloxi)etil-2-(2,4- diclorfenil)]-1H-imidazol [1]; sulfat acid de (+)-1-[2-(aliloxi)etil-2-(2,4- diclorfenil)]- 1H-imidazol [2]		261-351-5 [1] 281-291-3 [2]	58594-72-2 [1] 83918-57-4 [2]	Xn; R20/22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
613-066-00-6	terbumeton (ISO) 2-terț-butilamino-4-etilamino-6-metoxi-1,3,5-triazin		251-637-8	33693-04-8	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
613-091-00-2	diclorură morfamquat [1] sulfat morfamquat[2]		225-062-8 [1]	4636-83-3 [1] 29873-36-7 [2]	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52-53	Xn; R: 22-36/37/38-52/53 S: (2-)22-36-61		
613-098-00-0	N-(n-octil)-2-pirolidinonă		403-700-8	2687-94-7	C; R34 N; R51-53	C; N R: 34-51/53 S: (1/2-)23-26-36/37/39-45-61		
613-130-00-3	hexaconazole (ISO) (RS)-2-(2,4-diclorfenil)-1-(1H-1,2,4-triazolil-1)hexanol-2		—	79983-71-4	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-131-00-9	piroquilon (ISO) 1,2,5,6-tetrahidropiro[3,2,1-ij]chinolinonă-4		—	57369-32-1	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)61		
613-134-00-5	myclobutanil (ISO) 2-(4-clorfenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)hexanitril		—	88671-89-0	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 Xi; R36 N; R51-53	Xn; N R: 22-36-51/53-63 S: (2-)36/37-46-61		
613-137-00-1	methabenzthiazuron (ISO) 1-(1,3-benzotiazolil-2)1,3-dimetiluree		242-505-0	18691-97-9	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-139-00-2	metulfuron-metil metil-2-(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-ilcarbamilsulfamoi) benzoate		—	74223-64-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
614-001-00-4	nicotine (ISO) 3-(N-metil-2-pirolidimil)piridină		200-193-3	54-11-5	T+; R27 T; R25 N; R51-53	T+; N R: 25-27-51/53 S: (1/2-)36/37-45-61		
614-006-00-1	brucină 2,3-dimetoxistricnină		206-614-7	357-57-3	T+; R26/28 R52-53	T+ R: 26/28-52/53 S: (1/2-)13-45-61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
614-007-00-7	sulfat de brucină [1] azotat de brucină [2] 2,3-dimetoxi-stricidin-10-onă, mono[(R)-1-metilheptil 1,2-benzendicarboxilat] [3] 2,3-dimetoxi-stricidin-10-onă, compus cu S-mono(1-metilheptil)-1,2-benzendicarboxilat (1:1) [4]		225-432-9 [1] 227-317-9 [2] 269-439-5 [3] 269-710-8 [4]	4845-99-2 [1] 5786-97-0 [2] 68239-26-9 [3] 68310-42-9 [4]	T+; R26/28 R52-53	T+ R: 26-36/37/38-40-42/53 S: (1/2-)13-45-61		
615-006-00-4	2-metil- <i>m</i> -fenilen diizocianat [1] 4-metil- <i>m</i> -fenilen diizocianat [2] <i>m</i> -toliliden diizocianat [3] toluen-2,6-di-izocianat [1] toluen-2,4-di-izocianat [2] toluen-diizocianat [3]	C	202-039-0 [1] 209-544-5 [2] 247-722-4 [3]	91-08-7 [1] 584-84-9 [2] 26471-62-5 [3]	Carc. Cat. 3; R40 T+; R26 Xi; R36/37/38 R42/43 R52-53	T+ R: 26-36/37/38-40-42/43-52/53 S: (1/2-)23-36/37-45-61	C ≥ 20 %; T+; R26-36/37/38-40-42/43 7 % ≤ C < 20 %; T+; R26-40-42/43 1 % ≤ C < 7 %; T; R23-40-42/43 0.1 % ≤ C < 1 %; Xn; R20-42	2
616-010-00-9	tosilcloramidă de sodiu		204-854-7	127-65-1	Xn; R22 R31 C; R34 R42	C R: 22-31-34-42 S: (1/2-)7-22-26-36/37/39-45		
616-034-00-X	pyracarbolid (ISO) 3,4-dihidro-6-metil-2H-pirran-5-carboxamilidă		246-419-4	24691-76-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
616-035-00-5	cimoxamil 2-ciano- <i>N</i> -[etilamino]carbonil]-2-(methoxiimino)acetamidă		261-043-0	57966-95-7	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
617-004-00-9	1,2,3,4-tetrahidro-1-naftil hidroperoxid		212-230-0	771-29-9	O; R7 Xn; R22 C; R34 N; R50-53	O; C; N R: 7-22-34-50/53 S: (1/2-)3/7-14-26-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %; C; R22-34 10 % ≤ C < 25 %; C; R34 5 % ≤ C < 10 %; Xi; R36/37/38	
617-006-00-X	bi(a,a-dimerilbenzil) peroxid		201-279-3	80-43-3	O; R7 Xi; R36/38 N; R51-53	O; Xi; N R: 7-36/38-51/53 S: (2-)3/7-14-36/37/39-61		
617-008-00-0	peroxid de dibenzoil peroxid de benzoil		202-327-6	94-36-0	E; R2 Xi; R36 R43	E; Xi; R: 2-36-43 S: (2-)3/7-14-36/37/39		
650-007-00-3	chlordimeform (ISO) N ² -(4-clor-o-tolyl)-N ¹ ,N ¹ -dimetilformamidină		228-200-5	6164-98-3	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R21/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-40-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
650-008-00-9	draxolon (ISO) 4-(2-clorfenilhidrazon)-3-metil-5-izoxazolână		227-197-8	5707-69-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-) 22-24-36/37-45-60-61		
650-009-00-4	clorhidrat de chlordimeform monoclorhidrat de N ¹ -(4-clor-o-tolil)-N,N-dimetilformamidină clorhidrat de N ² -(4-clor-o-tolil)-N ¹ ,N ¹ -dimetilformamidină		243-269-1	19750-95-9	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		
650-033-00-5	esfenvalerate (ISO) (S)-a-ciano-3-fenoxi- benzil-(S)-2-(4-clorfenil)-3-metilbutirat		—	66230-04-4	T; R23/25 R43 N; R50-53	T; N R: 23/25-43-50/53 S: (1/2-)24-36/37/39-45-60-61		
650-041-00-9	triasulfuron (ISO) 1-[2-(2-cloretoksi)fenilsulfonil]-3-(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazimil-2)uree		—	82097-50-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

ANEXA ID

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
006-090-00-8	fenilcarbamat de 2-(3-iodoprop-2-in-1-iloxi)etil		408-010-0	88558-41-2	Xn; R20 Xi; R41 R52-53	Xn R: 20-41-52/53 S: (2-)22-26-39-61		
014-016-00-0	Amestec de: 1,3-dihex-5-en-1-il-1,1,3,3-tetrametildisiloxan; 1,3-dihex-n-en-1-il-1,1,3,3-tetrametildisiloxan		406-490-6	—	N; R51-53	N R51-53 S: 61		
015-164-00-9	P,P'-(1-hidroxi)etil)bi(fosfonat acid)dihidrat de calciu		400-480-5	36669-85-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		
015-165-00-4	Amestec de: tiobi(4,1-fenilen)-S,S',S',S'-tetrafenildisulfoni bihexafluorofosfat; hexafluorofosfat de difenil(4-feniltiofenil)sulfoni		404-986-7	—	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)15-26-39-60-61		
015-166-00-X	3,9-bi(2,6-di-ter-butil- 4-metilfenoxil-2,4,8,10-tetraoxa-3,9-difospiro[5,5]undecan		410-290-4	80693-00-1	R53	R: 53 S: 61		
015-167-00-5	acid 3-(hidroxi)fenilfosfoni) propanoic		411-200-6	14657-64-8	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
601-050-00-1	benzen, C ₁₀ -C ₁₃ -alchil derivații		267-051-0	67774-74-7	N; R50	N R: 50 S: 61		
601-051-00-7	4-fenilbutenă-1		405-980-7	768-56-9	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)37-61		
602-083-00-4	pentabrom derivat de difenil eter pentabromdifenil eter		251-084-2	32534-81-9	Xn; R48/21/22 R64 N; R50-53	Xn; N R: 48/21/22-50/53-64 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
602-084-00-X	1,1-diclor-1-fluoretan		404-080-1	1717-00-6	N; R52-53-59	N R: 52/53-59 S: 59-61		
603-128-00-0	2-(fenilmetoxi)naftalină		405-490-3	613-62-7	R53	R: 53 S: 61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
603-129-00-6	1-terț-butoxiopropanol-2		406-180-0	57018-52-7	R10 Xi; R41	Xi R: 10-41 S: (2-)26-39		
603-130-00-1	Amestec de izomeri ai: a-[[dimetil]bifenil]-w-hidroxioli(oxitilenă)		406-325-8	—	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)39-61		
603-131-00-7	Amestec 3:1 de: 1-deoxi-1-[metil-(1-oxododecil)amino]-D-glucitol; 1-deoxi-1-[metil-(1-oxotetradecil)amino]-D-glucitol		407-290-1	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
603-132-00-2	2-hidroxi-metil-9-metil-6-(1-metiletil)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan		408-200-3	63187-91-7	Xi; R38-41 R52-53	Xi R: 38-41-52/53 S: (2-)26-37/39-61		
603-133-00-8	Amestec de: 3-[(4-amino-2-clor-5-nitrofenil)amino]-propandiol-1,2; 3,3'-(2-clor-5-nitro-1,4-fenilendiimino)bi(propandiol-1,2)		408-240-1	—	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)22-36-61		
603-134-00-3	Amestec de dodecil și tetradecil difenil eteri substituiți. Substanța este obținută prin reacția Friedel Crafts. Catalizatorul este separat din produșii de reacție. Difenil eterul este substituit de către grupele alchil C1-C10. Grupele alchil sunt legate aleatoriu între C1 și C6. Se utilizează 50/50 C12 și C14 linear.		410-450-3	—	R53	R: 53 S: 61		
603-135-00-9	bi[[2,2',2''-nitrolietri-[etanolato]]-1-N,O]-bi[2-(2-metoxietoxi)etoxi]-titan		410-500-4	—	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61		
603-136-00-4	3-[(4-(bi(2-hidroxi)amino)-2-nitrofenil)amino]-1-propanol		410-910-3	104226-19-9	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)24-37-61		
603-137-00-X	1 amestec de: 1-deoxi-1-[metil-(1-oxohexadecil)amino]-D-glucitol; 1-deoxi-1-[metil-(1-oxooctadecil)amino]-D-glucitol		411-130-6	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
603-138-00-5	3-(2,2-dimetil-3-hidroxi)propil)toluen; (alt.); 2,2-dimetil-3-(3-metilfenil)propanol		403-140-4	103694-68-4	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
604-050-00-X	4-clor-o-cresol 4-clor-2-metil fenol		216-381-3	1570-64-5	T; R23 C; R35 N; R50	T; C; N R: 23-35-50 S: (1/2)/26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %; T; C; R23-35 10 % ≤ C < 25 %; C; R20-35 5 % ≤ C < 10 %; C; R20-34 3 % ≤ C < 5 %; Xn; R20-36/37/38 1 % ≤ C < 3 %; Xi; R36/37/38	
604-051-00-5	3,5-bi[(3,5-di-tert-butil-4-hidroxi)benzil]- 2,4,6-trimetilfenol		401-110-5	87113-78-8	R52-53	R: 52/53 S: 61		
604-052-00-0	2,2'-metilenbi(6-(2H-benzotriazolil-2)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol)		403-800-1	103597-45-1	R53	R: 53 S: 61		
604-053-00-6	2-metil-4-(1,1-dimetiletil)-6-(1-metil- pentadecil)-fenol		410-760-9	157661-93-3	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2-)/24-37-60-61		
604-054-00-1	Amestec de: 2-metoxi-4-(tetrahidro-4- metilen-2H-piraniil-2)-fenol; 4-(3,6-dihidro-4- metil-2H-piraniil-2)-2-metoxifenol		412-020-0	—	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)/24-37-61		
604-055-00-7	2,2'-[(3,3',5,5'-tetrametil-(1,1'-bifenil)-4,4'- diil)-bi(oximetilen)]-bi-oxiran		413-900-7	85954-11-6	Muta. Cat.3; R40	Xn R: 40 S: (2-)/22-36-37		
605-027-00-7	Un amestec de: 3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-4,7- metano-1H-indenă-6-carboxaldehidă; 3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-4,7-metano-1H- inden-5-carboxaldehidă		410-480-7	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)/24-37-61		
606-051-00-0	4-pentilciclohexanonă		406-670-4	61203-83-6	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
606-052-00-6	4-(N,N-dibutilamino)-2-hidroxi-2'- carboxibenzofenonă		410-410-5	54574-82-2	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-272-00-5	fluroxypyr-meptyl (ISO) [1] fluroxypyr-butometyl (ISO) [2] acetat de metilheptil, O-(4-amino-3,5-diclor- 6-fluor-2-piridiloxi) [1] acetat de 2-butoxi-1-metiletil, O-(4-amino- 3,5-diclor-6-fluor-2-piridiloxi) [2]		279-752-9 [1] —	81406-37-3 [1] 154486-27-8 [2]	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
607-273-00-0	7-(2,6-dimetil-8-(2,2-dimetilbutiriloxi)-1,2,6,7,8,8a-hexahidro-1-naftil)-3,5-dihidroheptanoat de amoniu		404-520-2	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-274-00-6	2-(N-benzil-N-metilamino)etil 3-amino-2-butenolat		405-350-1	54527-73-0	R43 N: R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
607-275-00-1	benzoiloxibenzen-4-sulfonat de sodiu		405-450-5	66531-87-1	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-276-00-7	bi [(1-metilimidazo)-(2-etil-hexanoat)], complex al zincului		405-635-0	—	Xi; R38-41 N: R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2-)26-37/39-60-61		
607-277-00-2	Un amestec de: clorhidrat de 2-(hexiltio)etilamină; propionat de sodiu		405-720-2	—	Xn; R22 Xi; R41 R43 N: R51-53	Xn; N R: 22-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-278-00-8	Amestec de izomeri ai: fenilnaftalensulfonat de sodiu; naftilbensensulfonat de sodiu		405-760-0	—	Xi; R41 R43 R52-53	Xi R: 41-43-52/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-279-00-3	Un amestec de: bi(maleat acid) n-octadecilaminodietil; naftalat acid maleat acid de n-octadecilaminodietil		405-960-8	—	R43 N: R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
607-280-00-9	4-clor-1-hidroxiutan-1-sulfonat de sodiu		406-190-5	54322-20-2	Xn; R22 Xi; R36 R43	Xn R: 22-36-43 S: (2-)22-26-36/37		
607-281-00-4	Amestec de C7-C9 alchil 3-[3-(2H-benzotriazolil-2)-5-(1,1-dimetil)-4-hidroxifenil] propionați ramificați și lineari		407-000-3	127519-17-9	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-282-00-X	acetat de 2-acetoximetil-4-benziloxibutil-1		407-140-5	131266-10-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
607-283-00-5	E-etil-4-oxo-4-fenilcrotonat		408-040-4	15121-89-8	Xn; R21/22 Xi; R38-41 R43 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-38-41-43-50/53 S: (2-)26-36/37/39-60-61		
607-284-00-0	Amestec 9:1 de: 3,3'-(1,4-fenilbibi(carbonilimino-3,1-propanedilimino))bi(10-amino-6,1,3-diclor-4,1,1-trifenodioxazindisulfonat) de sodiu; 3,3'-(1,4-fenilbibi(carbonilimino-3,1-propanedilimino))bi(10-amino-6,1,3-diclor)-4,1,1-trifenonodioxazindisulfonat de litiu		410-040-4	136213-76-8	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-285-00-6	Amestec de: acid 7-[[3-(aminofenil)sulfonil]amino]-naftalen-1,3-disulfonic; 7-[[3-(aminofenil)sulfonil]amino]-naftalen-1,3-disulfonat de sodiu; 7-[[3-(aminofenil)sulfonil]amino]-naftalen-1,3-disulfonat de potasiu		410-065-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-286-00-1	Amestec de: 7-[[3-[[4-[(2-hidroxi-naftil)azo]fenil]azo]fenil]sulfonil]amino]-naftalen-1,3-disulfonat de sodiu/potasiu		410-070-8	141880-36-6	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-24-37-61		
607-287-00-7	O-(1-metil-2-metacrililoxi-etil)-1,2,3,6-tetrahidroftalat de O'-metil		410-140-8	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-288-00-2	(c-(3-(1-(3-(e-6-diclor-5-cianopirimidin-f-il(metil)amino)propil)-1,6-dihidro-2-hidroxi-4-metil-6-oxo-3-piridilazo)-4-sulfonatofenilsulfamoi)ftalocianin-a,b,d-trisulfonat(6-)]nickelato II tetrasodic, unde a este 1 sau 2 sau 3 sau 4, b este 8 sau 9 sau 10 sau 11, c este 15 sau 16 sau 17 sau 18, d este 22 sau 23 sau 24 sau 25 și unde e și f împreună sunt respectiv 2 și 4 sau 4 și 2		410-160-7	148732-74-5	Xi; R36 R43 R52-53	Xi R: 36-43-52/53 S: (2-)22-26-36/37-61		
607-288-00-8	acid 3-(3-(4-(2,4-bi(1,1-dimetilpropil)fenoxi)butilaminocarbonil-4-hidroxi-1-naftalenil)tio)propanoic		410-370-9	105488-33-3	R53	R: 53 S: 61		
607-290-00-3	Amestec (raport necunoscut) de: 1-C14-C18-alchiloxicarbonil-2-(3-aliloxi-2-hidroxi)propoxicarbonil)etan-1-sulfonat de amoniu; 2-C14-C18-alchiloxicarbonil-1-(3-aliloxi-2-hidroxi)propoxicarbonil)etan-1-sulfonat de amoniu		410-540-2	—	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
607-291-00-9	dodecil-w-(C5/C6-cicloalchil)alchil carboxilat		410-630-1	104051-92-5	R53	R: 53 S: 61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
607-292-00-4	Amestec de: acid [1-(metoximetil)-2-(C12-alcoxi)-etoxil]acetic; acid [1-(metoximetil)-2-(C14-alcoxi)-etoxil] acetic		410-640-6	—	Xi; R38-41 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2-)26-37/39-60-61		
607-293-00-X	Amestec de: N-aminoetilpiperazoniu mono-2,4,6-trimetilnonildifenil eter di-sulfonat; N-aminoetilpiperazoniu di-2,4,6-trimetilnonildifenil eter di-sulfonat		410-650-0	—	Xi; R41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 41-43-51/53 S: (2-)26-36/37/39-61		
607-294-00-5	2-benzotrioxi-1-hidroxi-tetan-sulfonat de sodiu		410-680-4	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-295-00-0	Amestec de: fosfonoetan-1,2-dicarboxilat tetrasodic; fosfonobutan-1,2,3,4-tetracarboxilat hexasodic		410-800-5	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
607-296-00-6	Amestec de: pentaeritriol tetraesterii acidului heptanoic și acidului 2-ethylhexanoic		410-830-9	—	R53	R: 53 S: 61		
607-297-00-1	acid (E-E)-3,3'-(1,4-fenilenedimetiliden)bi(2-oxobornan-10-sulfonic)		410-960-6	92761-26-7	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
607-298-00-7	2-(trimetilamoniu)etoxycarboxibenzen-4-sulfonat		411-010-3	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-36/37		
607-299-00-2	3-(acetililo)-2-metil-propanoat de metil		411-040-7	97101-46-7	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
607-300-00-6	[2-(5-clor-2,6-difluorpirimidin-4-ilamino)-5-(b-sulfamoil-c-d-sulfonatofalocianin-a-il-K4,N29,N30,N31,N32-sulfonilamino)benzoato(5-)]cuprat (II) trisodic, unde a = 1,2,3,4; b = 8,9,10,11; c = 15,16,17,18; d = 22,23,24,25		411-430-7	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-301-00-1	Amestec de: acid dodecanoic; poliesteri (1-7)lactați ai acidului dodecanoic		411-860-5	—	Xi; R38-41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 38-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
607-302-00-7	Amestec de: acid tetradecanoic; poliesteri (1-7)lactați ai acidului tetradecano		411-910-6	—	Xi; R38-41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 38-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-303-00-2	acid 1-ciclopropil-6,7-difluor-1,4-dihydro-4-oxochinolin-3-carboxilic		413-760-7	93107-30-3	Repr. Cat.3; R62 R52-53	Xn R: 62-52/53 S: (2-)22-36/37-61		
608-023-00-3	4-(4-clorfenil)-2-fenil-2-[(1H-1,2,4-triazolil-1)metil] butanitril		406-140-2	114369-43-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
608-024-00-9	2-(4-(N-butil-N-fenilamino)fenil)etilen-1,1,2-tricarbonitril		407-650-8	97460-76-9	R53	R: 53 S: 61		
608-025-00-4	2-nitro-4,5-bis(benziloxi)fenilacetanitril		410-970-0	117568-27-1	R53	R: 53 S: 61		
609-053-00-X	hidrazin-tri-nitrometan		414-850-9	—	E; R3 O; R8 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/25 R43	E; T R: 45-3-8-23/25-43 S: 53-45		
610-010-00-2	2-brom-1-(2-furil)-2-nitroetilen		406-110-9	35950-52-8	Xn; R22-48/22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-34-43-48/22-50/53 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45-60-61		
611-043-00-5	Amestec 2:1:1 de: N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')-h-6-[2-amino-4-(sau 6)-hidroxi-(sau 4-amino-2-hidroxi)fenilazo]-6''-(1-carbanilolil-2-hidroxi)prop-1-enilazo)-5',5'''-disulfamoil-3,3''-disulfonatobi (naftalen-2,1'-azobenzen-1,2'-diolato-O(1),O(2)') - cromat trisodic; N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')-h-6,6''-bi(1-carbanilolil-2-hidroxi)prop-1-enilazo)-5',5'''-disulfamoil-3,3''-disulfonatobi (naftalen-2,1'-azobenzen-1,2'-diolato-O(1),O(2)') - cromat trisodic; N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')-h-6,6''-bi(2-amino-4-(sau 6) - hidroxi-(sau 4-amino-2-hidroxi)fenilaz)-5',5'''-disulfamoil-3,3''-disulfonatobi (naftalen-2,1'-azobenzen-1,2'-diolato-O(1),O(2)') - cromat trisodic;		402-850-1		Xi; R41 52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
611-044-00-0	Amestec de: bi [1-[(2-hidroxi-5-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]-cromat (1-) de terf-alchil(C12-C14)amoniu; bi [1-[(2-hidroxi-4-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]-cromat (1-) de terf-alchil(C12-C14)amoniu bi[1-[[5-(1,1-dimetilpropil)-2-hidroxi-3-nitrofenil]azo]-2-naftalenolato(2-)]-cromat(1-) de terf-alchil(C12-C14)amoniu; [1-[(2-hidroxi-5-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]-[1-(2-hidroxi-5-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]-cromat (1-) de terf-alchil(C12-C14)amoniu; [[1-[[5-(1,1-dimetilpropil)-2-hidroxi-3-nitrofenil]azo]-2-naftalenolato(2-)]-[1-(2-hidroxi-5-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]-cromat (1-) de terf-alchil(C12-C14)amoniu; [(1-(4(sau 5)-nitro-2-oxidofenilazo)-2-naftolato)(1-(3-nitro-2-oxido-5-pentilfenilazo)-2-naftolato)]-cromat (1-) de terf-alchil(C12-C14)amoniu + C1268;		403-720-7	117527-94-3	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
611-045-00-6	2-[4-[N-(4-acetoxibutil)-N-etil]amino-2-metilfenilazo]-3-acetil-5-nitrotiofen		404-830-8	—	R53	R: 53 S: 61		
611-046-00-1	4,4'-diamino-2-metilazobenzen		407-590-2	43151-99-1	T; R25 Xn; R48/22 R43 N; R50-53	T; N R: 25-43-48/22-50/53 S: (1/2)/22-28-36/37-45-60-61		
611-047-00-7	Amestec 1:1 de: 2-[[4-[N-etil-N-(2-acetoxetil)amino]fenil]azo]-5,6-diclorbenzotiazol; 2-[[4-[N-etil-N-(2-acetoxetil)amino]fenil]azo]-6,7-diclorbenzotiazol		407-890-3	111381-11-4	R53	R: 53 S: 61		
611-048-00-2	Amestec (1:1) de: 2-[[4-[bi(2-acetoxetil)amino]fenil]azo]-5,6-diclorbenzotiazol; 2-[[4-[bi(2-acetoxetil)amino]fenil]azo]-6,7-diclorbenzotiazol		407-900-6	111381-12-5	R53	R: 53 S: 61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
611-049-00-8	7-[4-(3-dietilaminopropilamino)-6-(3-dietilamoniopropilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino]-4-hidroxi-3-(4-fenilazo)fenilazo)-nafalen-2-sulfonat, acid acetic, acid lactic (2:1:1)		408-000-6	118658-98-3	Xn; R48/22 R43 R52-53	Xn R: 43-48/22-52/53 S: (2-22-36/37-61		
611-051-00-9	clorură de 2-(4-(N-etil-N-(2-hidroxi)etil)amino-2-metilfenil)azo-6-metoxi-3-metil-benzotiazol		411-110-7	136213-74-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
611-052-00-4	apă - [5-[[2,4-dihidroxi-5-[(2-hidroxi-3,5-dinitrofenil)azo]fenil]azo]-2-naftalensulfonat de sodiu], complex cu fier		400-720-9	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
612-156-00-2	Amestec de: clorură de trihexadecilmetilamoniu; clorură de dihexadecilmetilamoniu		405-620-9	—	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
612-157-00-8	clorhidrat de (Z)-1-benzo[b]tlen-2-iletanon oxima		410-780-8	—	Xn; R22-48/22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-43-48/22-51/53 S: (2-)22-26-36/37/39-61		
612-158-00-3	Amestec de: bi(5-dodecil-2-hidroxi)benzald-oximat) cupru (II), grupul C12-alcil este ramificat; 4-dodecilsalicilaldoxima		410-820-4	—	R53	R: 53 S: 61		
612-159-00-9	Prođuși de reacție ai: trimetilhexameten diaminei (un amestec de 2,2,4-trimetil-1,6-hexandiamină și 2,4,4-trimetil-1,6-hexandiamină, conform listelor IESCE), Epoxid 8 (derivat ai mono[(C10-C16-alciloxi)metil]oxiran) și ai acidului p-toluen-sulfonic		410-880-1	—	Xn; R22 C; R34 N; R50-53	C; N R: 22-34-50/53 S: (1/2-)23-26-36/37/39-45-60-61		
613-149-00-7	2-terț-butil-5-(4-terț-butilbenzilto)-4-clorpiridazinonă-3(2H)		405-700-3	96489-71-3	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
613-150-00-2	2,2'-[3,3'-(piperazindil-1,4)dipropil]bi(1H-benzimidazo[2,1-b]benzo[1,m,n][3,8]fenantrolin-1,3,6-trionă		406-295-6	—	R53	R: 53 S: 61		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
613-151-00-8	1-(3-mesiloxi-5-tritiloximetil-2-D-treofuril)timină		406-360-9	104218-44-2	R53	R: 53 S: 61		
613-152-00-3	N-(4,6-dimetoxipirimidinil-2)carbamat de fenil		406-600-2	89392-03-0	R43 N: R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-153-00-9	2,3,5-triclorpiridină		407-270-2	16063-70-0	R52-53	R: 52/53 S: 61		
613-154-00-4	2-amino-4-clor-6-metoxipirimidină		410-050-9	5734-64-5	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)22		
613-155-00-X	5-clor-2,3-difluorpiridină		410-090-7	89402-43-7	R10 Xn; R22 R52-53	Xn R: 10-22-52/53 S: (2-)23-36-61		
613-156-00-5	2-butil-4-clor-5-formilimidazol		410-260-0	83857-96-9	R43 N: R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-157-00-0	2,4-diamino-5-metoximetilpirimidină		410-330-0	54236-98-5	Xn; R22-48/22 Xi; R36	Xn R: 22-36-48/22 S: (2-)22-26-36		
613-158-00-6	2,3-diclor-5-trifluormetil-piridină		410-340-5	69045-84-7	Xn; R20/22 Xi; R41 R43 N: R51-53	Xn; N R: 20/22-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
613-159-00-1	4-[2-[4-(1,1-dimetiletil)fenil]-etoxi]chinazolin		410-580-0	120928-09-8	T; R25 Xn; R20 N: R50-53	T; N R: 20-25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
613-160-00-7	(1S)-2-metil-2,5-diazobicyclo[2.2.1]heptan dibromhidrat		411-000-9	125224-62-6	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
615-022-00-1	3-izocianatosulfonil-2-tiofen-carboxilat de met		410-550-7	79277-18-2	E; R2 R14 Xn; R48/22 R42/43	E; Xn R: 2-14-42/43-48/22 S: (2-)22-30-35-36/37		

Nr. index	Denumire chimică	Note referitoare la substanțe	Nr. CE	Nr. CAS	Clasificare	Etichetare	Limite de concentrație	Note referitoare la preparate
615-023-00-7	esterul metilic al acidului 2-(izocianatosulfonilmetil)benzoic; (alt.): 2-(izocianatosulfonilmetil)benzoat de metil		410-900-9	83056-32-0	R10 R14 Muta. Cat.3; R40 Xn; R20-48/22 Xi; R41 R42	Xn R: 10-14-20-40-41-42-48/22 S: (2-)23-26-36/37/39		
616-044-00-4	N-(3,5-diclor-4-etil-2-hidroxi-fenil)-2-(3-pentadecilfenoxi)-butanamid		402-510-2	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
616-045-00-X	2'-(4-clor-3-ciano-5-formil-2-tienilazo)-5'-dietilamino-2-metoxiacetanilid		405-190-2	122371-93-1	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)22-24-37-61		
616-046-00-5	N-(2-(6-clor-7-metilpirazolo(1,5-b)-1,2,4-triazolil-4)propil)-2-(2,4-di-terf-pentilfenoxi)octanamidă		406-390-2	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-047-00-0	2,2',2'',2'''-(etilendinitrilotetrakis-N,N-di(C16)alchilacetamidă; 2,2'',2''',2''''-(etilendinitrilotetrakis-N,N-di(C18)alchilacetamidă		406-640-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
616-048-00-6	3'-trifluorometilzobutiranilidă		406-740-4	1939-27-1	Xn; R48/22 N; R51-53	Xn; N R: 48/22-51/53 S: (2-)22-36-61		
616-049-00-1	2-(2,4-bi(1,1-dimetil)fenoxi)-N-(3,5-diclor-4-etil-2-hidroxi-fenil)-hexanamidă		408-150-2	99141-89-6	R53	R: 53 S: 61		
616-050-00-7	N-[2,5-diclor-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi)-fenil-aminocarbonil]-2,6-difluorbenzamidă		410-690-9	103055-07-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
616-051-00-2	Amestec de: 2,4-bi(N'-(4-metilfenil)-ureido)-toluen; 2,6-bi(N'-(4-metilfenil)-ureido)-toluen		411-070-0	—	R53	R: 53 S: 61		
617-015-00-9	bi(4-metilbenzoi)peroxid		407-950-9	895-85-2	E; R2 O; R7 N; R50-53	E; N R: 2-7-50/53 S: (2-)7-14-36/37/39-47-60-61		
650-032-00-X	ciproconazol (ISO) (2RS,3RS;2RS,3SR)-2-(4-clorfenil)-3-ciclopropil-1-(1H-1,2,4-triazolil-1)butanol-2		—	94361-06-5	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53-63 S: (2-)36/37-60-61		

ANEXA 2

A se vedea Actul de aderare din 2003 (JO L 236, 23.9.2003, p. 96).

—

ANEXA 3A

A se vedea Actul de aderare din 2003 (JO L 236, 23.9.2003, p. 96).

ANEXA 3B

A se vedea Actul de aderare din 2003 (JO L 236, 23.9.2003, p. 96).

ANEXA 4A

**„B.10. MUTAGENITATEA –TESTUL IN VITRO DE ABERAȚIE CROMOZOMIALĂ
PE CELULE DE MAMIFERE****1. METODA**

Prezenta metodă este reprodusă după orientarea OCDE TG 473, Testul *in vitro* de aberație cromozomială pe celule de mamifere (1997).

1.1. INTRODUCERE

Scopul testului *in vitro* de aberație cromozomială este destinat depistării agenților care provoacă aberații cromozomiale ale structurii în celulele de mamifere, în cultură (1) (2) (3). Aberațiile structurale pot fi de două tipuri, cromozomiale sau cromatidice. La majoritatea mutagenilor chimici, aberațiile induse sunt de tip cromatidic, dar se produc și aberații de tip cromozomial. O poliploidie crescută poate să indice că un produs chimic are capacitatea de a provoca aberații ale numărului de cromozomi. Cu toate acestea, prezenta metodă nu este destinată determinării aberațiilor numerice și, în general, nu se utilizează în acest scop. Mutațiile cromozomiale și fenomenele conexe sunt cauza multor maladii genetice umane și există dovezi suficiente ale implicării mutațiilor cromozomiale și a fenomenelor conexe, care provoacă modificări ale oncogenelor și ale genelor supresoare de tumori din celulele somatice, în inducerea cancerului la oameni și la animalele de laborator.

Testul *in vitro* de aberație cromozomială poate să utilizeze culturi de linii celulare stabilite, sușe celulare sau culturi celulare primare. Celulele utilizate se selectează în funcție de potențialul de dezvoltare în cultură, stabilitatea cariotipului, numărul de cromozomi, diversitatea cromozomilor și frecvența aberațiilor cromozomiale spontane.

Pentru realizarea *in vitro* a testului este necesar să se utilizeze o sursă exogenă pentru activarea metabolică. Sistemul de activare metabolică de acest tip nu poate să reproducă integral condițiile celulelor de mamifere *in vivo*. Ar trebui să se acorde atenție evitării condițiilor care ar putea să conducă la obținerea unor rezultate pozitive care nu reflectă o mutagenitate intrinsecă, condiții care s-ar putea datora modificărilor de pH, de osmolaritate sau unor valori mari ale citotoxicității (4) (5).

Prezentul test se utilizează pentru depistarea substanțelor cu posibile efecte mutagene și cancerigene pentru mamifere. Mulți compuși care dau rezultate pozitive la acest test sunt cancerigeni pentru mamifere; cu toate acestea, nu există o corelație perfectă între prezentul test și cancerigenitate. Corelația depinde de clasa de produse chimice și sunt tot mai multe dovezi că există agenți cancerigeni care nu se depistează prin prezentul test deoarece este posibil ca aceștia să acționeze printr-un alt mecanism decât cel care provoacă leziuni directe ale ADN.

A se vedea și introducerea generală din partea B.

1.2. DEFINIȚII

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

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

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

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

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

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

Poliploidie: multiplicare a numărului (n) de cromozomi haploizi, alta decât diploidia (adică $3n$, $4n$ etc.).

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

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Culturile de celule sunt expuse la substanța de testat, atât cu, cât și fără activare metabolică. După expunerea celulelor la substanța de testat, acestea se tratează la intervale de timp prestabilite cu o substanță de inhibare a metafazei (de ex. Colcemid® sau colchicină), se recoltează, se colorează și celulele în metafază sunt analizate la microscop pentru detectarea aberațiilor cromozomiale.

1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.4.1. **Preparatele**

1.4.1.1. *Celulele*

Se pot utiliza diferite linii celulare, sușe de celule sau culturi de celule primare, inclusiv celule umane (de ex. celule de hamster chinezesc, limfocite din sângele periferic uman sau al altor mamifere).

1.4.1.2. *Mediile și condițiile de cultură*

Se recomandă utilizarea mediilor de cultură și a condițiilor de incubare (vasele de cultură, concentrația CO_2 , temperatura și umiditatea) corespunzătoare pentru dezvoltarea culturilor. Se impune controlul regulat al liniilor și sușelor celulare, pentru verificarea stabilității numărului modal de cromozomi și a absenței contaminării cu micoplasmă și, dacă se constată contaminarea, celulele nu se mai folosesc. Ar trebui să se cunoască perioada ciclului celular normal pentru celulele și condițiile de cultură utilizate.

1.4.1.3. *Prepararea culturilor*

Liniile și sușele celulare stabilite: celulele se prepară plecând de la culturile de rezervă, se însămânțează în mediul de cultură într-o anumită densitate, astfel încât culturile să nu ajungă la confluență înainte de momentul recoltării, apoi se incubează la $37\text{ }^\circ\text{C}$.

Limfocitele: sângele complet, tratat cu un anticoagulant (de ex. heparina), sau limfocitele separate obținute de la subiecți sănătoși se adaugă la mediul de cultură ce conține un mitogen (de ex. fitoheماغlutinină) și se incubează la $37\text{ }^\circ\text{C}$.

1.4.1.4. *Activarea metabolică*

Se recomandă ca expunerea celulelor la substanța de testat să se realizeze atât în prezența, cât și în absența sistemului de activare metabolică corespunzător. Sistemul cel mai frecvent utilizat este o fracție postmitochondrială la care s-au adăugat cofactori (S9), preparată din ficat de rozătoare tratat cu agenți de inducție enzimatică, de ex. Aroclor 1254 (6) (7) (8) (9) sau un amestec de fenobarbitonă și β -naftoflavonă (10) (11) (12).

Fracția postmitochondrială se utilizează, de obicei, la concentrații cuprinse între limitele 1-10 % vol./vol. în mediul experimental final. Compoziția unui sistem de activare metabolică poate să depindă de clasa din care face parte substanța chimică de testat. În unele cazuri, s-ar putea să fie convenabilă utilizarea mai multor concentrații ale fracției postmitochondriale.

O serie de realizări, inclusiv crearea prin inginerie genetică a unor linii celulare care exprimă enzime activatoare specifice, poate furniza potențialul pentru o activare endogenă. Alegerea liniilor celulare ar trebui să fie justificată din punct de vedere științific (de ex. prin importanța izoenzimei citocromului P450 pentru metabolismul substanței de testat).

1.4.1.5. *Substanța de testat/prepararea*

Substanțele de testat în stare solidă ar trebui să se prepare sub formă de soluții sau suspensii în solvenții sau vehiculele corespunzătoare, care, dacă este cazul, se diluează înaintea tratamentului celulelor. Substanțele de testat lichide se pot adăuga direct în sistemele experimentale și se diluează înainte de utilizare în tratamentul celulelor. Se recomandă utilizarea preparatelor proaspete de substanță de testat, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora în caz de păstrare.

1.4.2. **Condițiile de testare**

1.4.2.1. *Solventul/vehiculul*

Solventul/vehiculul ar trebui să fie ales astfel încât să nu existe suspiciunea reacției chimice a acestuia cu substanța de testat și să nu afecteze negativ supraviețuirea celulelor și activitatea S9. Utilizarea altor solvenți/vehicule decât cele recunoscute ar trebui să fie justificată cu date care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se prefere un solvent/vehicul în soluție/dispersione apoasă. La testarea substanțelor instabile în apă, solventul organic utilizat nu ar trebui să conțină apă. Apa se poate elimina prin adăugarea unei site moleculare.

1.4.2.2. *Concentrațiile de expunere*

Printre criteriile ce trebuie să fie avute în vedere la determinarea dozei maxime sunt citotoxicitatea, solubilitatea în sistemul experimental și modificările de pH sau osmolalitate.

Citotoxicitatea ar trebui să se determine cu și fără activare metabolică în experimentarea principală, utilizând un indicator corespunzător al integrității și dezvoltării celulare, ca gradul de confluență, numărul de celule viabile sau indexul mitotic. Ar putea fi utilă determinarea citotoxicității și solubilității într-un test preliminar.

Ar trebui să se utilizeze cel puțin trei concentrații analizabile. Dacă o substanță este citototoxică, concentrațiile respective ar trebui să acopere un domeniu de toxicități de la maximă la mică sau lipsa toxicității; aceasta semnifică, de obicei, concentrații care ar trebui să fie separate printr-un factor cuprins între 2 și $\sqrt{10}$ maximum. În momentul recoltării, concentrația maximă ar trebui să determine o reducere importantă a gradului de confluență, a numărului de celule sau a indexului mitotic (pentru toate mai mare de 50 %). Indexul mitotic variază în timp după tratament și reprezintă doar o măsură indirectă a efectelor citotoxice/citostatice. Cu toate acestea, indexul mitotic este acceptabil pentru culturile în suspensie în care alte determinări de toxicitate pot să fie dificile și nepractice. Datele de cinetică a ciclului celular, cum ar fi timpul de generare medie (TGM), ar putea să reprezinte informații suplimentare. TGM este totuși o medie generală, care nu demonstrează întotdeauna existența unei subpopulații întârziate; chiar și creșterile ușoare ale timpului de generare medie pot să genereze o întârziere foarte substanțială a momentului în care numărul de aberații este optim.

Pentru substanțele relativ necitotoxice, concentrația experimentală maximă trebuie să fie cea mai mică dintre următoarele: 5 μ l/ml, 5 mg/ml sau 0,01 M.

Pentru substanțele relativ insolubile care nu sunt toxice la concentrații mai mici decât concentrația la care sunt insolubile, doza maximă utilizată ar trebui să fie o concentrație superioară limitei de solubilitate în mediul final de cultură la terminarea perioadei de tratament. În unele cazuri (de ex. atunci când toxicitatea se manifestă doar la o concentrație mai mare decât concentrația minimă de insolubilitate), se recomandă să se încerce mai multe concentrații până la apariția precipitării. Ar putea fi utilă evaluarea solubilității la începutul și la sfârșitul tratamentului, deoarece solubilitatea poate să varieze în timpul expunerii în sistemul experimental datorită prezenței celulelor, S9, serului etc. Insolubilitatea se poate constata cu ochiul liber. Ar trebui ca precipitarea să nu interfereze cu determinarea rezultatelor.

1.4.2.3. *Martorii negativi și pozitivi*

La fiecare experiment, ar trebui să se includă simultan martorii pozitivi și negativi (solvent și vehicul), atât cu, cât și fără activare metabolică. În prezența unui sistem de activare metabolică, substanța utilizată ca martor pozitiv ar trebui să fie aceea care necesită activare pentru a da un răspuns mutagen.

Ca martori pozitivi ar trebui să se utilizeze un elastogen cunoscut, la niveluri de expunere care se estimează că determină o creștere reproductibilă și detectabilă în raport cu zgomotul de fond, ceea ce demonstrează sensibilitatea sistemului de testare.

Concentrațiile martorilor pozitivi ar trebui să fie selectate astfel încât să se obțină efecte clare, dar care să nu permită identificarea imediată a lamelelor codificate. În tabelul următor se prezintă exemple de substanțe care se pot utiliza ca martori pozitivi:

Starea activării metabolice	Substanța	Nr. CAS	Nr. IESCE
Absența activării metabolice exogene	metansulfonat de metil	66-27-3	200-625-0
	metansulfonat de etil	62-50-0	200-536-7
	etil nitrozouree	759-73-9	212-072-2
	mitomicină C	50-07-7	200-008-6
	4-nitrochinolină-N-oxid	56-57-5	200-281-1
Prezența activării metabolice exogene	benzo[a] piren	50-32-8	200-028-5
	ciclofosfamidă	50-18-0	200-015-4
	ciclofosfamidă monohidrat	6055-19-2	

Se pot utiliza și alte substanțe corespunzătoare ca martori pozitivi. Ar trebui să se aibă în vedere utilizarea ca martori pozitivi a unor substanțe din aceeași clasă de produse chimice, dacă sunt disponibile.

Pentru fiecare moment de recoltare, ar trebui să se utilizeze ca martori negativi solvenți sau vehicule singure în mediul de tratare, care se tratează în aceleași condiții ca și culturile tratate. În plus, ar trebui să se utilizeze și martori netratați, cu excepția cazului în care există date din testele anterioare care să ateste că solventul selectat nu prezintă efecte vătămătoare sau mutagene.

1.4.3. Modul de lucru

1.4.3.1. *Tratamentul cu substanța de testat*

Celulele în stadiu de proliferare se tratează cu substanța de testat în prezența sau absența unui sistem de activare metabolică. Tratamentul limfocitelor ar trebui să înceapă la aproximativ 48 de ore de la stimularea mitogenică.

- 1.4.3.2. Pentru fiecare concentrație ar trebui să se realizeze în mod normal teste pe culturi de celule în dublu exemplar, procedură recomandată cu fermitate pentru culturile cu martor negativ/solvent. Dacă datele testelor anterioare pot să dovedească existența unor diferențe minime între culturile duble (13) (14), se poate preconiza utilizarea unor culturi unice pentru fiecare concentrație testată.

Substanțele în stare gazoasă sau cele volatile ar trebui să fie testate prin metode corespunzătoare, de exemplu în vase de cultură închise ermetic (15) (16).

1.4.3.3. *Momentul recoltării culturilor*

În primul experiment, expunerea celulelor la substanța de încercat ar trebui să se realizeze atât în prezența, cât și în absența activării metabolice, timp de 3-6 ore, și să se procedeze la prelevarea probelor după un interval de timp egal cu de 1,5 ori durata ciclului celular normal de la inițierea tratamentului (12). Dacă rezultatele testului sunt negative, atât în prezența, cât și în absența activării, ar trebui să se repete testul fără activare, cu tratament continuu până în momentul prelevării probelor care să fie egal cu aproximativ de 1,5 ori durata ciclului celular normal. S-ar putea ca unele produse chimice să fie detectate mai ușor, prin prelungirea timpului de tratament/prelevare a probelor la mai mult de 1,5 ori durata ciclului celular. Rezultatele negative obținute în prezența activării metabolice necesită o confirmare pentru fiecare caz. Pentru cazurile în care se consideră că nu este necesară confirmarea rezultatelor negative, trebuie să se prezinte o justificare.

1.4.3.4. Prepararea cromozomilor

Culturile celulare se tratează cu Colcemid® sau colchicină, de obicei timp de 1-3 ore înainte de recoltare. Fiecare cultură celulară se recoltează și se prelucrează separat pentru prepararea cromozomilor. Prepararea cromozomilor include tratamentul hipotonic al celulelor, precum și fixarea și colorarea acestora.

1.4.3.5. Analiza

Toate lamelele, inclusiv cele cu martorii pozitivi și negativi, ar trebui să fie codificate independent înaintea analizei microscopice. Deoarece procedurile de fixare generează adesea scindarea unei proporții de celule în metafază cu pierdere de cromozomi, toate celulele înregistrate ar trebui, prin urmare, să conțină un număr de centromeri egal cu numărul modal ± 2 pentru toate tipurile de celule. Pentru fiecare concentrație și fiecare martor ar trebui să se înregistreze cel puțin 200 de celule în metafază bine etalate, repartizate în mod egal între culturile în dublu exemplar, dacă este cazul. Atunci când se constată un număr mare de aberații, numărul menționat se poate reduce.

Deși scopul testului este detectarea aberațiilor cromozomial-structurale ale cromozomilor, este important să se semnaleze cazurile de poliploidie și endoreduplicare, dacă se constată apariția acestora.

2. DATELE

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Unitatea experimentală este celula și, prin urmare, ar trebui să se evalueze procentul de celule care prezintă o aberație cromozomială sau mai multe aberații cromozomiale. Se întocmește o listă cu diferitele tipuri de aberații cromozomiale și se specifică numărul și frecvența acestora pentru culturile experimentale și cele martor. Lacunele se înregistrează și se prezintă separat, dar în general nu se includ în frecvența totală a aberațiilor.

De asemenea, se înregistrează rezultatele determinărilor concomitente de citotoxicitate realizate pentru toate culturile tratate și pentru cele martor negativ în principalele teste de aberații.

Ar trebui să se prezinte date pentru fiecare cultură. În plus, toate datele ar trebui să fie prezentate centralizat sub formă de tabel.

Nu este necesară verificarea unui răspuns pozitiv net. Rezultatele nesigure ar trebui să fie clarificate prin realizarea de teste suplimentare în care este preferabil să se modifice condițiile experimentale. Necesitatea confirmării rezultatelor negative s-a discutat la punctul 1.4.3.3. În cazul experimentelor suplimentare, ar trebui să se aibă în vedere modificările parametrilor cercetați pentru a extinde gama condițiilor evaluate. Parametrii studiați, susceptibili de modificare, includ intervalele dintre concentrații și condițiile de activare metabolică.

2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Există câteva criterii pentru determinarea unui rezultat pozitiv, ca o creștere în funcție de concentrație sau o creștere reproductibilă a numărului de celule cu aberații cromozomiale. În primul rând, ar trebui să se aibă în vedere relevanța biologică a rezultatelor. Pentru evaluarea rezultatelor testelor se pot utiliza metode statistice (3) (13). Semnificația statistică nu ar trebui să fie singurul factor determinant pentru a decide cu privire la un răspuns pozitiv.

O creștere a numărului de celule poliploide poate să indice faptul că substanța de testat este capabilă să inhibe procesele mitotice și să producă aberații ale numărului de cromozomi. O creștere a numărului de celule cu cromozomi endoreduplicați poate să indice faptul că substanța de testat poate inhiba avansarea ciclului celular (17) (18).

Dacă rezultatele obținute pentru o substanță de testat nu îndeplinesc criteriile menționate anterior, se consideră că substanța respectivă nu este mutagenă în sistemul respectiv.

Deși majoritatea experimentelor vor da în mod clar rezultate pozitive sau negative, în rare cazuri datele stabilite vor exclude posibilitatea unei concluzii definitive cu privire la activitatea substanței de testat. Rezultatele pot să rămână nesigure sau discutabile independent de numărul de repetări ale testului.

Rezultatele pozitive ale unui test *in vitro* de aberație cromozomială indică faptul că substanța de testat provoacă aberații cromozomiale ale structurii în celulele somatice de mamifere, în cultură. Rezultatele negative indică faptul că, în condițiile experimentale, substanța de testat nu provoacă aberații cromozomiale în celulele somatice de mamifere, în cultură.

3. RAPORTAREA

RAPORTUL TESTULUI

Raportul testului trebuie să conțină următoarele informații:

Solventul/vehiculul:

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

Celulele:

- tipul și sursa celulelor;
- caracteristicile cariotipului și motivul alegerii celulelor utilizate;
- absența micoplasmei, dacă este cazul;
- date privind durata ciclului celular;
- sexul donatorilor de sânge, sângele complet sau limfocite izolate, mitogenul utilizat;
- numărul de reînsămânțări, dacă este cazul;
- metodele de întreținere a culturilor celulare, dacă este cazul;
- numărul modal de cromozomi.

Condițiile de testare:

- identitatea substanței de inhibare a metafazei, concentrațiile acesteia și timpul de expunere a celulelor;
- justificarea alegerii concentrațiilor și numărului de culturi, inclusiv datele de citotoxicitate și limitele de solubilitate, dacă sunt disponibile;
- compoziția mediului, concentrația de CO₂, dacă este cazul;
- concentrația substanței de testat;
- volumul vehiculului și al substanței de testat adăugate;
- temperatura de incubare;
- timpul de incubare;
- durata tratamentului;
- densitatea celulară la însămânțare, dacă este cazul;
- tipul și compoziția sistemului de activare metabolică, inclusiv criteriile de acceptabilitate;
- martorii pozitivi și negativi;
- metodele de preparare a lamelor;
- criteriile pentru numărătoarea aberațiilor;

- numărul de metafaze analizate;
- metodele de măsurare a toxicității;
- criteriile utilizate la caracterizarea studiilor ca fiind pozitive, negative sau nesigure.

Rezultatele:

- semnele de toxicitate, de exemplu, gradul de confluență, datele privind ciclul celular, numărătoarea celulelor, indexul mitotic;
- semnele de precipitare;
- datele privind valoarea pH-ului și osmolalitatea mediului de tratare, dacă s-au determinat;
- definirea aberațiilor, inclusiv a lacunelor;
- numărul de celule cu aberații cromozomiale și tipul aberațiilor cromozomiale, prezentate separat pentru fiecare cultură tratată și cultură martor;
- variațiile ploidiei, dacă există;
- relația doză-răspuns, dacă este posibil;
- analizele statistice, dacă există;
- datele privind martorii negativi (solvent/vehicul) și pozitivi;
- datele anterioare privind martorii negativi (solvent/vehicul) și pozitivi, cu domeniile, valorile medii și deviațiile standard.

Discutarea rezultatelor.

Concluziile.

4. BIBLIOGRAFIE

- (1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: *Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.
- (2) Ishidate, M. Jr. and Sofumi, T. (1985), The *In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture, in: *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. et al., (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 427-432.
- (3) Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Anderson, G. and Zeiger E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environ. Molec. Mutagen* 10 (suppl.10), pp. 1-175.
- (4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, pp. 147-204.
- (5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Res.*, 268, pp. 297-305.
- (6) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (7) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.

- (8) Natarajan, A. T., Bates, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res.*, 37, pp. 83-90.
 - (9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*, *Mutation Res.*, 66, pp. 277-290.
 - (10) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternative to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
 - (11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: de Serres, F. J. Fouts, J. R. Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds), *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
 - (12) Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Ivett, J. L., Kirkland, D. J. Morita, T., Mosesso, P., Sofumi, T. (1994), Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Res.*, 312, pp. 241-261.
 - (13) Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. and Phillips, B. (1989), Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., (cd) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
 - (14) Soper, K. A. and Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, *Mutation Res.*, 312, pp. 139-149.
 - (15) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91-103.
 - (16) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.
 - (17) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, pp. 403-413.
 - (18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1362-1364."
-

ANEXA 4B

„B.11. MUTAGENITATEA – TESTUL IN VIVO DE ABERAȚIE CROMOZOMIALĂ PE MĂDUVĂ OSOASĂ DE MAMIFERE**1. METODA**

Prezenta metodă este reprodusă după orientarea OCDE TG 475, Testul *in vivo* de aberație cromozomială pe măduvă osoasă de mamifere (1997).

1.1. INTRODUCERE

Testul *in vivo* de aberație cromozomială pe măduva osoasă de mamifere se utilizează la detectarea aberațiilor cromozomiale provocate de substanța de testat în structura celulelor din măduva osoasă a mamiferelor, de obicei, rozătoare (1) (2) (3) (4). Aberațiile structurale pot să fie de două tipuri, cromozomiale sau cromatidice. O poliploidie crescută poate să indice că un produs chimic poate să provoace aberații ale numărului de cromozomi. La majoritatea mutagenilor chimici, aberațiile induse sunt de tip cromatidic, dar se produc și aberații de tip cromozomial. Mutațiile cromozomiale și fenomenele conexe sunt cauza multor maladii genetice umane și există dovezi suficiente ale implicării mutațiilor cromozomiale și a fenomenelor conexe, care provoacă modificări ale oncogenelor și ale genelor supresoare de tumori din celulele somatice, în inducerea cancerului la oameni și în sistemele experimentale.

În prezentul test se utilizează, de obicei, rozătoare. Țesutul-țintă în prezentul test este măduva osoasă, deoarece este un țesut puternic vascularizat și conține o populație de celule cu ciclu rapid care se pot izola și prelucra ușor. Alte specii și țesuturi-țintă nu fac obiectul prezentei metode.

Prezentul test de aberație cromozomială este relevant în special la evaluarea riscului mutagen, deoarece permite să se țină seama de factorii de metabolism *in vivo*, de farmacocinetică și de procesele de reparare a ADN-ului, deși aceștia pot să varieze între specii și între țesuturi. Un test *in vivo* este, de asemenea, util pentru studierea suplimentară a unui efect mutagen detectat printr-un test *in vitro*.

Dacă există dovezi că substanța de testat sau un metabolit reactiv nu atinge țesutul-țintă, utilizarea prezentului test nu este potrivită.

A se vedea și introducerea generală din partea B.

1.2. DEFINIȚII

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

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

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

Lacună: leziune acromatică mai mică decât lățimea unei cromatide și cu o eroare minimă de aliniere a cromatidei(cromatidelor).

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

Poliploidie: multiplicare a numărului (n) de cromozomi haploizi, alta decât diploidia (adică 3n, 4n etc.).

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

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Animalele se expun la substanța de testat printr-o cale de expunere corespunzătoare și se sacrifică în momente corespunzătoare după tratament. Înainte de sacrificare, animalele se supun tratamentului cu un agent de inhibare a metafazei (de exemplu, colchicină sau Colcemid®). Apoi, din celulele de măduvă osoasă se realizează preparate cromozomiale care se colorează și celulele în metafază se examinează pentru a se pune în evidență aberațiile cromozomiale.

1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.4.1. **Preparatele**

1.4.1.1. *Selectarea speciilor de animale*

Se utilizează, de obicei, șobolani, șoareci și hamsteri chinezești, deși se poate utiliza orice specie de mamifere potrivită. Se recomandă utilizarea unor animale adulte tinere sănătoase din sușe folosite în mod curent în laborator. La începutul studiului, greutatea animalelor ar trebui să prezinte variații minime, care să nu depășească $\pm 20\%$ din greutatea medie a fiecărui sex.

1.4.1.2. *Condițiile de adăpost și de hrană*

Se aplică condițiile generale menționate în introducerea generală din partea B, dar umiditatea atinsă ar trebui să fie de 50-60 %.

1.4.1.3. *Pregătirea animalelor*

Animalele adulte tinere sănătoase se distribuie în mod aleatoriu în grupe martor și grupe de tratament. Cuștile ar trebui să se aranjeze astfel încât posibilele efecte datorate amplasării acestora să fie reduse la minimum. Animalele sunt identificate individual. Se procedează la aclimatizarea animalelor la condițiile de laborator timp de minimum cinci zile.

1.4.1.4. *Prepararea dozelor*

Substanțele de testat în stare solidă ar trebui să se prepare sub formă de soluții sau suspensii în solvenții sau vehiculele corespunzătoare și să se dilueze, dacă este cazul, înainte de a fi administrate animalelor. Substanțele de testat lichide se pot administra direct sau dilua înainte de administrare. Se recomandă utilizarea preparatelor proaspete de substanță de testat, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora în caz de păstrare.

1.4.2. **Condițiile de testare**

1.4.2.1. *Solventul/vehiculul*

Solventul/vehiculul nu ar trebui să producă efecte toxice la dozele utilizate și nu ar trebui să existe suspiciunea reacției chimice a acestuia cu substanța de testat. Utilizarea altor solvenți/vehicule decât cele recunoscute ar trebui să fie justificată cu date care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se prefere utilizarea unui solvent/vehicul apos.

1.4.2.2. *Martorii*

Pentru fiecare sex și pentru fiecare test ar trebui să se prevadă martori pozitivi și negativi (solvenți/vehicule), utilizați în paralel. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, manipularea animalelor din grupele martor ar trebui să fie identică cu cea a animalelor din grupele tratate.

Martorii pozitivi ar trebui să producă aberații cromozomiale de structură *in vivo* la nivelurile de expunere preconizate a genera o creștere detectabilă în raport cu fondul. Dozele de martor pozitiv ar trebui să fie alese astfel încât să se obțină efecte clare, dar fără a revela imediat examinatorului identitatea lamelelor codificate. Pentru martorul pozitiv, se poate accepta administrarea pe o cale diferită față de cea utilizată în cazul

substanței de testat și doar o singură prelevare a probelor. Se poate avea în vedere utilizarea unor martori pozitivi din aceeași clasă de substanțe chimice, dacă sunt disponibili. În tabelul următor se prezintă exemple de substanțe care se pot utiliza ca martori pozitivi:

Substanța	Nr. CAS	Nr. IESCE
metansulfonat de etil	62-50-0	200-536-7
etil nitrozouree	759-73-9	212-072-2
mitomicină C	50-07-7	200-008-6
ciclofosfamidă	50-18-0	200-015-4
ciclofosfamidă monohidrat	6055-19-2	
trietilenmelamină	51-18-3	200-083-5

Martorii negativi, tratați doar cu solvent sau cu vehicule și manipulați în același fel ca și grupele tratate, ar trebui să fie incluși la fiecare prelevare de probe, cu excepția cazului în care se dispune de date acceptabile privind variabilitatea interanimale și frecvențele celulelor cu aberații cromozomiale, provenite de la martori anteriori. Dacă, pentru martorii negativi, se face o singură prelevare de probe, momentul cel mai potrivit pentru prelevarea probelor este momentul primei prelevări. În plus, ar trebui să se utilizeze și martori netratați, cu excepția cazului în care există date de la martori anteriori sau date publicate, care să ateste că solventul/vehiculul selectat nu induce efecte vătămătoare sau mutagene.

1.5. MODUL DE LUCRU

1.5.1. Numărul și sexul animalelor

Fiecare grupă tratată și martor include minimum cinci animale analizabile din fiecare sex. Dacă în momentul studiului există date disponibile din studii pe aceeași specie, în care s-a folosit aceeași cale de expunere, care să demonstreze lipsa unor diferențe substanțiale de toxicitate între sexe, atunci va fi suficientă testarea pe animale de un singur sex. Dacă expunerea umană la produse chimice este specifică sexului, ca în cazul unor produse farmaceutice, testul ar trebui să se realizeze pe animale de sex corespunzător.

1.5.2. Modalitatea de tratare

Substanțele de testat se administrează de preferință o singură dată. Substanțele de testat se mai pot administra în doze fracționate, adică două tratamente în aceeași zi la distanță de doar câteva ore, pentru a facilita administrarea unui volum mare de material. Alte modalități de tratare ar trebui să fie justificate în mod științific.

Prelevarea probelor după tratament ar trebui să se realizeze în două momente diferite din aceeași zi. Pentru rozătoare, primul interval de timp este egal cu de 1,5 ori durata ciclului celular normal (acesta din urmă fiind în mod normal de 12-18 ore) după tratament. Deoarece timpul necesar pentru absorbția și metabolismul substanței de testat, precum și acțiunea acesteia asupra cineticii ciclului celular pot să aibă efecte asupra timpului optim pentru detectarea aberației cromozomiale, se recomandă să se procedeze la o altă prelevare de probe la 24 de ore după prima prelevare. Dacă administrarea dozelor durează mai mult de o zi, ar trebui să se procedeze la o prelevare de probe la un interval de timp egal cu de 1,5 ori durata ciclului celular normal după tratamentul final.

Înainte de sacrificare, se procedează la injectarea intraperitoneală a animalelor cu o doză corespunzătoare de agent de inhibare a metafazei (de ex. Colcemid® sau colchicină). Probele de la animale se prelevează apoi la un interval corespunzător. Pentru șoareci intervalul respectiv este de aproximativ 3-5 ore; pentru hamsterii chinezești intervalul este de 4-5 ore. Celulele se recoltează din măduva osoasă și se examinează pentru detectarea aberațiilor cromozomiale.

1.5.3. Dozele

Dacă, în lipsa datelor corespunzătoare, se realizează un studiu pentru stabilirea dozelor, acesta ar trebui să se realizeze în același laborator și să utilizeze aceeași specie, aceeași sușă de animale de același sex, iar regimul de tratare să fie același ca cel ce urmează să fie utilizat în studiul principal (5). În caz de toxicitate, se utilizează trei doze diferite pentru prima prelevare. Aceste trei doze ar trebui să acopere un domeniu de toxicități, de la toxicitatea maximă până la toxicitatea minimă sau lipsă. Pentru prelevările ulterioare se utilizează doar doza maximă. Doza maximă se definește ca doza ce produce astfel de semne de toxicitate, încât dozele mai mari, administrate în același mod, se estimează că sunt letale. Substanțele cu activitate biologică specifică la doze mici netoxice (cum ar fi hormonii și mitogenii) pot face excepție de la criteriile de stabilire a dozelor și să fie stabilite pentru fiecare caz în parte. Doza maximă se mai poate defini ca doza care produce anumite semne de toxicitate în măduva osoasă (de ex. o reducere cu mai mult de 50 % a indexului mitotic).

1.5.4. Test limită

Dacă un test realizat cu o doză de minimum 2 000 mg/kg greutate corp, administrată într-o singură repriză sau în două reprize în aceeași zi, nu produce efecte toxice detectabile și dacă o genotoxicitate este improbabilă pe baza datelor referitoare la substanțe cu o structură apropiată, se poate considera că un studiu complet cu utilizarea a trei doze de mărimi diferite nu este necesar. Pentru studiile pe termen lung, doza limită este de 2 000 mg/kg greutate corp/zi pentru un tratament de până la 14 zile și de 1 000 mg/kg greutate corp/zi pentru un tratament mai lung de 14 zile. În funcție de expunerea umană preconizată, ar putea fi necesară o doză mai mare în testul limită.

1.5.5. Administrarea dozelor

Substanța de testat se administrează, de obicei, prin cavitatea nazală cu ajutorul unui tub stomacal sau al unei canule de intubație adaptate sau printr-o injecție intraperitoneală. Se pot accepta și alte căi de administrare, dacă se pot justifica. Volumul maxim de lichid care se poate administra prin sondă gastrică introdusă prin cavitatea nazală sau prin injecție într-o singură repriză depinde de dimensiunea animalului de laborator. Volumul ar trebui să fie mai mic sau egal cu 2 ml/100g greutate corp. Utilizarea unor volume mai mari decât cel menționat ar trebui să se justifice. Cu excepția substanțelor iritante și corozive, care vor prezenta în mod normal efecte exacerbate la concentrații mai mari, variația volumului administrat ar trebui să fie redusă la minimum prin ajustarea concentrației, astfel încât să se asigure un volum constant pentru toate dozele.

1.5.6. Prepararea cromozomilor

Măduva osoasă se extrage imediat după sacrificare, se expune la o soluție hipotonică și se fixează. Apoi, celulele se întind pe lamele și se colorează.

1.5.7. Analiza

Se procedează la determinarea indexului mitotic, care este o măsură a citotoxicității, pe cel puțin 1 000 de celule pentru fiecare animal tratat (inclusiv martorii pozitivi) și pentru fiecare animal martor negativ netratat.

Pentru fiecare animal se analizează minimum 100 de celule. Dacă se observă un număr mai mare de aberații, numărul specificat se poate reduce. Toate lamelele, inclusiv cele cu celule de la martorii pozitivi și negativi, ar trebui să fie codificate independent, înainte de examinarea la microscop. Deoarece metodele de preparare a lamelelor conduc adesea la scindarea unei fracții de celule în metafază cu pierdere de cromozomi, toate celulele examinate ar trebui, prin urmare, să conțină un număr de centromeri egal cu $2n \pm 2$.

2. DATELE**2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR**

Se recomandă prezentarea sub formă de tabel a datelor pentru fiecare animal. Unitatea experimentală este animalul. Pentru fiecare animal, ar trebui să se evalueze numărul de aberații per celulă și procentul de celule cu aberație sau aberații cromozomiale de structură. Diferitele tipuri de aberații cromozomiale de structură ar trebui să fie consemnate împreună cu numărul și frecvența acestora pentru grupele tratate și cele martor. Lacunele se consemnează și se raportează separat, dar în general acestea nu se includ în frecvența totală a aberațiilor. Dacă nu există dovezi privind diferența de răspunsuri între sexe, datele de la ambele sexe se pot combina pentru analiza statistică.

2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Există câteva criterii pentru determinarea unui rezultat pozitiv, ca o creștere în funcție de doză a numărului relativ de celule cu aberații cromozomiale sau o creștere clară a numărului de celule cu aberații dintr-o grupă cu o doză unică la un singur moment de prelevare. În primul rând, ar trebui să se aibă în vedere relevanța biologică a rezultatelor. Pentru evaluarea rezultatelor testelor se poate recurge și la ajutorul unor metode statistice (6). Semnificația statistică nu ar trebui să fie singurul factor determinant pentru a decide cu privire la un răspuns pozitiv. Rezultatele nesigure ar trebui să fie clarificate prin teste suplimentare, realizate de preferință printr-o modificare a condițiilor experimentale.

O creștere a numărului de celule poliploide poate să indice faptul că substanța de testat poate produce aberații ale numărului de cromozomi. O creștere a numărului de celule cu cromozomi endoreduplicați poate să indice faptul că substanța de testat poate să inhibe avansarea ciclului celular (7) (8).

Dacă rezultatele pentru o substanță de testat nu îndeplinesc criteriile menționate anterior, substanța respectivă se consideră a fi nemutagenă în prezentul test.

Deși majoritatea experimentelor vor da în mod clar rezultate pozitive sau negative, în unele cazuri rare, datele stabilite vor exclude posibilitatea unei concluzii definitive cu privire la activitatea substanței de testat. Rezultatele pot să rămână nesigure sau discutabile independent de numărul de experimente efectuate.

Rezultatele pozitive ale unui test de aberație cromozomială *in vivo* indică faptul că o substanță provoacă aberații cromozomiale în măduva osoasă a speciei testate. Rezultatele negative indică faptul că, în condițiile experimentale, substanța de testat nu provoacă aberații cromozomiale în măduva osoasă a speciei testate.

Ar trebui discutată probabilitatea ca substanța de testat sau metaboliții acesteia să ajungă în circulația generală sau în mod specific în țesutul-țintă (de ex. toxicitatea sistemică).

3. RAPORTAREA

RAPORTUL TESTULUI

Raportul testului trebuie să conțină următoarele informații:

Solventul/vehiculul:

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

Animalele de laborator:

- specia/sușa utilizată;
- numărul, vârsta și sexul animalelor;
- sursa, condițiile de adăpost și hrană etc.;
- greutatea fiecărui animal la începutul testului, inclusiv intervalul de greutate, greutatea medie și deviația standard pentru fiecare grupă.

Condițiile de testare:

- martorii pozitivi și negativi (solvent/vehicul);
- datele din studiul pentru stabilirea dozelor, dacă s-a realizat;
- justificarea alegerii dozelor utilizate;
- detalii privind prepararea substanței de testat;

- detalii privind administrarea substanței de testat;
- justificarea căii de administrare selectate;
- metodele de verificare pentru a constata dacă substanța de testat a ajuns în circulația generală sau în țesutul-țintă, dacă este cazul;
- conversia concentrației substanței de testat (ppm) în hrană/apa de băut în doză reală (mg/kg greutate corp/zi), dacă este cazul;
- detalii privind calitatea hranei și a apei;
- descrierea amănunțită a modalităților de tratare și de prelevare a probelor;
- metodele de măsurare a toxicității;
- identitatea substanței de inhibare a metafazei, concentrația acesteia și durata tratamentului;
- metodele de preparare a lamelelor;
- criteriile pentru numărătoarea aberațiilor;
- numărul de celule analizate per animal;
- criteriile utilizate la caracterizarea studiilor ca fiind pozitive, negative sau nesigure.

Rezultatele:

- semnele de toxicitate;
- indexul mitotic;
- tipul și numărul aberațiilor, consemnate separat pentru fiecare animal;
- numărul total de aberații pentru fiecare grupă împreună cu numărul mediu și deviațiile standard;
- numărul de celule cu aberații pentru fiecare grupă împreună cu numărul mediu al acestora și deviațiile standard;
- variațiile ploidiei, dacă există;
- relația doză-răspuns, dacă este posibil;
- analizele statistice, dacă există;
- datele privind martorii negativi studiați în paralel;
- datele anterioare privind martorii negativi, cu domeniile, valorile medii și deviațiile standard;
- datele privind martorii pozitivi studiați în paralel.

Discutarea rezultatelor.

Concluziile.

4. BIBLIOGRAFIA

- (1) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, S. Venitt and J. M. Parry (eds), IRL Press, Oxford, Washington D. C., pp. 275-306.
- (2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987), Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, *Mutation Res.*, 189, pp. 157-165.

- (3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990), *In vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
 - (4) Tice, R. R., Hayashi, M., MacGregaro, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Pacchierotti, F., Preston, R. J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the *in Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, *Mutation Res.*, 312, pp. 305-312.
 - (5) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
 - (6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, D. J. Kirkland (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.
 - (7) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, pp. 403-413.
 - (8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1362-1364.
-

ANEXA 4C

„B.12. MUTAGENITATEA - TESTUL *IN VIVO* DE MICRONUCLEU PE ERITROCITE DE MAMIFERE

1. METODA

Prezenta metodă este reprodusă după orientarea OCDE TG 474, Testul *in vivo* de micronucleu pe eritrocite de mamifere (1997).

1.1. INTRODUCERE

Testul *in vivo* de micronucleu pe celule de mamifere se utilizează pentru detectarea leziunilor cromozomilor sau ale aparatului mitotic al eritroblaștilor produse de substanța de testat; detectarea se realizează prin analiza eritrocitelor prelevate din măduva osoasă și din celulele sângelui periferic ale animalelor, de obicei rozătoare.

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

Când un eritroblast din măduva osoasă evoluează într-un eritrocit policromatic, nucleul principal este expulzat; orice micronucleu care se formează poate să rămână în citoplasma anucleată. Micronucleele se vizualizează mai ușor în aceste celule cărora le lipsește nucleul principal. O creștere a frecvenței eritrocitelor policromatice micronucleate la animalele tratate indică producerea unei leziuni cromozomiale.

În prezentul test se utilizează în mod curent măduva osoasă a rozătoarelor deoarece eritrocitele policromatice se produc în acest țesut. Numărătoarea eritrocitelor (policromatice) imature micronucleate în sângele periferic este la fel de acceptabilă la toate speciile la care s-a demonstrat incapacitatea splinei de a elimina eritrocitele micronucleate sau care prezintă o sensibilitate specifică pentru detectarea agenților care produc aberații cromozomiale de natură structurală sau numerică. Există numeroase criterii care permit identificarea micronucleelor. Unul dintre acestea este identificarea prezenței sau absenței unui kinetocor sau a ADN centromeric în micronucleu. Frecvența eritrocitelor (policromatice) imature micronucleate este principalul criteriu. De asemenea, numărul de eritrocite (normocromatice) mature în sângele periferic care conține micronuclee printr-un număr dat de eritrocite mature se poate utiliza ca un criteriu în cazul tratării animalelor timp de patru săptămâni sau mai mult.

Prezentul test *in vivo* de micronucleu pe eritrocite de mamifere este relevant în special la evaluarea riscului mutagen, deoarece permite să se țină seama de factorii de metabolism *in vivo*, de farmacocinetică și de procesele de regenerare a ADN-ului, deși aceștia pot să varieze între specii, între țesuturi și între efectele genetice. Un test *in vivo* este, de asemenea, util pentru studiul suplimentar a unui efect mutagen detectat într-un sistem *in vitro*.

Dacă există dovezi că substanța de testat sau un metabolit reactiv nu atinge țesutul-țintă, utilizarea prezentului test nu este potrivită.

A se vedea și introducerea generală din partea B.

1.2. DEFINIȚII

Centromer (kinetocor): porțiuni sau porțiuni dintr-un cromozom care în timpul diviziunii celulare sunt legate cu fibrele fusului mitotic, ceea ce permite deplasarea ordonată a cromozomilor fiice către poli celulelor fiice.

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

Eritrocit normocromatic: eritrocit matur lipsit de ribozomi și care se poate distinge de eritrocitele policromatice imature cu ajutorul unor substanțe care colorează selectiv ribozomii.

Eritrocit policromatic: eritrocit imatur, aflat într-un stadiu intermediar de dezvoltare, care mai conține ribozomi și, prin urmare, se poate distinge de eritrocitele normocromatice mature cu ajutorul substanțelor care colorează selectiv ribozomii.

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Animalele sunt expuse la substanța de testat printr-o cale de expunere corespunzătoare. Dacă se utilizează măduva osoasă, animalele se sacrifică la momente potrivite după tratament, se extrage măduva osoasă, se prepară și se colorează lamelele (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Dacă se utilizează sângele periferic, acesta se colectează la momente potrivite după tratament, se depune pe lamele și se colorează (4) (8) (9) (10). Pentru studiile cu sânge periferic, celulele ar trebui să se recolteze cât se poate de repede după ultima expunere. Lamelele preparate se examinează pentru a depista prezența micronucleelor.

1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.4.1. **Preparatele**

1.4.1.1. *Selectarea speciilor de animale*

Dacă se utilizează măduvă osoasă, se recomandă șoareci și șobolani, deși se poate utiliza orice specie adecvată de mamifere. Când se utilizează sânge periferic, se recomandă șoareci. Cu toate acestea, se poate utiliza orice specie adecvată de mamifere, cu condiția să fie o specie la care s-a demonstrat incapacitatea splinei de a elimina eritrocitele micronucleate sau care prezintă o sensibilitate specifică pentru detectarea agenților care produc aberații cromozomiale de natură structurală sau numerică. Se recomandă utilizarea unor animale adulte tinere din sușe utilizate în mod curent în laborator. La începutul studiului, greutatea animalelor ar trebui să prezinte o variație minimă, ce nu trebuie să depășească $\pm 20\%$ din greutatea medie a fiecărui sex.

1.4.1.2. *Condițiile de adăpost și de hrană*

Se aplică condițiile generale menționate în introducerea generală din partea B, dar umiditatea atinsă ar trebui să fie de 50-60 %.

1.4.1.3. *Pregătirea animalelor*

Animalele adulte tinere sănătoase se distribuie în mod aleatoriu în grupe martor și grupe de tratament. Animalele sunt identificate individual. Se procedează la aclimatizarea animalelor la condițiile de laborator timp de minimum cinci zile. Cuștile ar trebui să se aranjeze astfel încât posibilele efecte datorate amplasării acestora să fie reduse la minimum.

1.4.1.4. *Prepararea dozelor*

Substanțele de testat în stare solidă ar trebui să se prepare sub formă de soluții sau suspensii în solvenții sau vehiculele corespunzătoare și să se dilueze, dacă este cazul, înainte de a fi administrate animalelor. Substanțele de testat lichide se pot administra direct sau dilua înainte de administrare. Se recomandă utilizarea preparatelor proaspete de substanță de testat, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora în caz de păstrare.

1.4.2. **Condițiile de testare**

1.4.2.1. *Solventul/vehiculul*

Solventul/vehiculul nu ar trebui să producă efecte toxice la dozele utilizate și nu ar trebui să existe suspiciunea reacției chimice a acestuia cu substanța de testat. Utilizarea altor solvenți/vehicule decât cele recunoscute ar trebui să fie justificată cu date care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se prefere utilizarea unui solvent/vehicul apos.

1.4.2.2. *Martorii*

Pentru fiecare sex și pentru fiecare test ar trebui să se prevadă martori pozitivi și negativi (solvent/vehicul), utilizați în paralel. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, manipularea animalelor din grupele martor ar trebui să fie identică cu cea a animalelor din grupele tratate.

Martorii pozitivi ar trebui să producă micronuclee *in vivo* la nivelurile de expunere preconizate a genera o creștere detectabilă în raport cu fondul. Dozele de martor pozitiv ar trebui să fie alese astfel încât să se obțină efecte clare, dar fără să releve imediat examinatorului identitatea lamelelor codificate. Pentru martorul pozitiv, se poate accepta administrarea pe o cale diferită de cea prin care se administrează substanța de testat cu o singură prelevare a probelor. În plus, se poate avea în vedere utilizarea unor martori pozitivi din aceeași clasă de produse chimice, dacă sunt disponibili. În tabelul următor se prezintă exemple de substanțe care se pot utiliza ca martori pozitivi:

Substanța	Nr. CAS	Nr. IESCE
metansulfonat de etil	62-50-0	200-536-7
N-etil-N-nitrozouree	759-73-9	212-072-2
mitomicină C	50-07-7	200-008-6
ciclofosamidă	50-18-0	200-015-4
ciclofosamidă monohidrat	6055-19-2	
trietilenmelamină	51-18-3	200-083-5

Martorii negativi, tratați doar cu solvent sau cu vehicul și manipulați în același fel ca grupele tratate, ar trebui să fie incluși la fiecare prelevare de probe, cu excepția cazului în care se dispune de date acceptabile privind variabilitatea interanimale și frecvența incidenței celulelor cu micronuclee, provenite de la martori anteriori. Dacă, pentru martorii negativi, se face o singură prelevare de probe, momentul cel mai potrivit pentru prelevarea probelor este momentul primei prelevări. În plus, ar trebui să se utilizeze și martori netratați, cu excepția cazului în care există date de la martori anteriori sau publicate, care să ateste că solventul/vehiculul selectat nu prezintă efecte vătămătoare sau mutagene.

Dacă se utilizează sânge periferic, se poate accepta o probă prelevată înainte de tratament în calitate de martor negativ, dar doar în studiile de scurtă durată pe sânge periferic (de ex. 1-3 tratamente), când datele rezultate se situează între limitele estimate pe baza datelor anterioare privind martorul.

1.5. MODUL DE LUCRU

1.5.1. Numărul și sexul animalelor

Fiecare grupă tratată și martor include minimum cinci animale analizabile din fiecare sex (11). Dacă în momentul studiului există date disponibile din studii pe aceleași specii, în care s-a folosit aceeași cale de expunere, care să demonstreze lipsa unor diferențe substanțiale de toxicitate între sexe, atunci va fi suficientă testarea pe animale de un singur sex. Dacă expunerea umană la produse chimice este specifică sexului, ca în cazul unor produse farmaceutice, testul ar trebui să se realizeze pe animale de sexul corespunzător.

1.5.2. Modalitatea de tratare

Nu se poate recomanda un program de tratament standard (adică unul, două sau mai multe tratamente la intervale de 24 de ore). Probele provenite de la un studiu cu administrare prelungită a dozelor sunt acceptabile, atâta timp cât pentru studiul respectiv s-a demonstrat un efect pozitiv sau, pentru un studiu negativ, atâta timp cât s-a demonstrat toxicitatea sau s-a utilizat doza limită și administrarea dozei a continuat până în momentul prelevării probelor. Pentru a facilita administrarea unui volum mare de material, substanțele de testat se pot administra și în doză fracționată, adică două tratamente în aceeași zi, la un interval de câteva ore.

Testul se poate realiza în două moduri:

- Substanța de testat se administrează animalelor într-o singură repriză. Probele de măduvă osoasă se prelevează de cel puțin două ori, prelevarea începând cel mai devreme la 24 de ore după tratament, fără să se prelungească mai mult de 48 de ore după tratament, cu intervale corespunzătoare între probe. Dacă prelevarea probelor se realizează mai devreme de 24 de ore după tratament, ar trebui să se justifice acest lucru. Probele de sânge periferic se prelevează cel puțin de două ori, dar nu mai devreme de 36

de ore după tratament, cu intervale corespunzătoare după prima probă și nu trebuie să depășească 72 de ore. Dacă la un moment de prelevare se înregistrează un rezultat pozitiv, prelevarea probelor încetează;

- (b) Dacă se practică două sau mai multe tratamente zilnice (de ex. două sau mai multe tratamente la intervale de 24 de ore), ar trebui ca prelevarea probelor să se realizeze o dată la un interval de timp cuprins între 18 și 24 de ore după tratamentul final pentru măduva osoasă și o dată într-un interval de timp cuprins între 36 și 48 de ore după tratamentul final pentru sângele periferic (12).

Dacă este relevant, se pot utiliza și alte momente de prelevare a probelor.

1.5.3. Dozele

Dacă, în lipsa datelor corespunzătoare, se realizează un studiu pentru stabilirea dozelor, acesta ar trebui să se realizeze în același laborator și să utilizeze aceeași specie, aceeași sușă de animale de același sex și regimul de tratare să fie același ca cel ce urmează să fie utilizat în studiul principal (13). În caz de toxicitate, se utilizează trei doze diferite pentru prima prelevare. Aceste trei doze ar trebui să acopere un domeniu de toxicități de la toxicitate maximă până la toxicitate minimă sau netoxicitate. Pentru prelevările ulterioare se utilizează doar doza maximă. Doza maximă se definește ca doza ce produce astfel de semne de toxicitate, încât dozele mai mari, administrate în același mod, se estimează că sunt letale. Substanțele cu activitate biologică specifică la doze mici netoxice (cum ar fi hormonii și mitogenii) pot face excepție de la criteriile de stabilire a dozelor și să fie stabilite pentru fiecare caz în parte. Doza maximă se mai poate defini ca doza care produce anumite semne de toxicitate în măduva osoasă (de ex. o reducere a proporției de eritrocite imature în raport cu numărul total de eritrocite din măduva osoasă sau din sângele periferic).

1.5.4. Test limită

Dacă un test realizat cu o doză de minimum 2 000 mg/kg greutate corp, administrată într-o singură repriză sau în două reprize în aceeași zi, nu produce efecte toxice detectabile și dacă o genotoxicitate este improbabilă pe baza datelor referitoare la substanțe cu o structură apropiată, se poate considera că un studiu complet cu utilizarea a trei doze de mărimi diferite nu este necesar. Pentru studiile pe termen lung, doza limită este de 2 000 mg/kg greutate corp/zi pentru un tratament de până la 14 zile și de 1 000 mg/kg greutate corp/zi pentru un tratament mai lung de 14 zile. În funcție de expunerea umană preconizată, s-ar putea să fie necesară o doză mai mare în testul limită.

1.5.5. Administrarea dozelor

Substanța de testat se administrează, de obicei, prin cavitatea nazală cu ajutorul unui tub stomacal sau al unei canule de intubație adaptate sau printr-o injecție intraperitoneală. Se pot accepta și alte căi de administrare, dacă se pot justifica. Volumul maxim de lichid care se poate administra prin sondă gastrică introdusă prin cavitatea nazală sau prin injecție într-o singură repriză depinde de dimensiunea animalului de laborator. Volumul ar trebui să fie mai mic sau egal cu 2 ml/100 g greutate corp. Utilizarea unor volume mai mari decât cel menționat ar trebui să se justifice. Cu excepția substanțelor iritante și corozive care vor prezenta în mod normal efecte exacerbate la concentrații mai mari, variația volumului testat ar trebui să fie redusă la minimum prin ajustarea concentrației, astfel încât să se asigure un volum constant pentru toate dozele.

1.5.6. Prepararea măduvei osoase/a sângelui

Celulele de măduvă osoasă se extrag în mod curent din femur sau tibie imediat după sacrificare. De obicei, celulele se extrag din femur sau tibie, se depun pe lamele și se colorează prin metodele stabilite. Sângele periferic se obține din vena caudală sau alte vase de sânge corespunzătoare. Celulele sanguine se colorează imediat supravital (8) (9) (10) sau se întind mai întâi pe lamele și apoi se colorează. Utilizarea unui colorant specific pentru ADN [de ex. oranj de acridină (14), Hoechst 33258 plus pironină -Y (15)] poate să elimine unele din artefacte datorită utilizării unui colorant nespecific pentru ADN. Avantajul menționat nu exclude utilizarea coloranților convenționali (de ex. Giemsa). Se pot utiliza și alte sisteme [de ex. coloane de celuloză pentru eliminarea celulelor nucleate (16)], cu condiția ca sistemele respective să se fi dovedit eficiente pentru prepararea micronucleelor în laborator.

1.5.7. Analiza

Pentru fiecare animal se determină proporția de eritrocite imature în raport cu numărul total de eritrocite (imature + mature) prin examinarea a cel puțin 200 de eritrocite pentru măduva osoasă și 1 000 de eritrocite pentru sângele periferic (17). Fiecare dintre lamele, inclusiv cele cu martori pozitivi și negativi, ar trebui codificată independent, înainte de analiza microscopică. Se identifică minimum 2 000 de eritrocite imature per animal pentru a determina incidența eritrocitelor imature micronucleate. Prin identificarea eritrocitelor

mature pentru depistarea micronucleelor se pot obține informații suplimentare. La examinarea lamelelor, proporția de eritrocite imature în raport cu numărul total de eritrocite ar trebui să fie mai mare de 20 % față de valoarea martorilor. Dacă animalele sunt tratate în mod continuu timp de patru săptămâni sau mai mult, se pot identifica, de asemenea, cel puțin 2 000 de eritrocite mature per animal pentru a constata incidența micronucleelor. Sistemele de analiză automată (analiza imaginii și citometria de flux a suspensiilor de celule) se pot utiliza în locul evaluării manuale, dacă sunt validate și justificate corespunzător.

2. DATELE

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Se recomandă prezentarea sub formă de tabel a datelor pentru fiecare animal. Unitatea experimentală este animalul. Pentru fiecare animal analizat se consemnează în tabel numărul de eritrocite imature examinate, numărul de eritrocite imature micronucleate și numărul de eritrocite imature, în raport cu numărul total de eritrocite. Dacă animalele se tratează continuu timp de patru săptămâni sau mai mult, ar trebui să se prezinte și datele privind eritrocitele mature, dacă s-a făcut colectarea acestora. Pentru fiecare animal se prezintă proporția de eritrocite imature în raport cu numărul total de eritrocite și, dacă se consideră că este cazul, procentul de eritrocite micronucleate. Dacă nu există dovezi privind diferența de răspunsuri între sexe, datele de la ambele sexe se pot combina pentru analiza statistică.

2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Există câteva criterii pentru determinarea unui rezultat pozitiv, cum ar fi o creștere în funcție de doză a numărului de celule micronucleate sau o creștere clară a numărului de celule micronucleate dintr-o grupă cu o doză unică la un singur moment de prelevare. În primul rând, ar trebui să se aibă în vedere relevanța biologică a rezultatelor. Pentru evaluarea rezultatelor testelor se poate recurge și la ajutorul unor metode statistice (18) (19). Semnificația statistică nu ar trebui să fie singurul factor determinant pentru a decide cu privire la un răspuns pozitiv. Rezultatele nesigure ar trebui să fie clarificate prin teste suplimentare, realizate de preferință printr-o modificare a condițiilor experimentale.

Dacă rezultatele pentru o substanță de testat nu îndeplinesc criteriile menționate anterior, substanța respectivă se consideră a fi nemutagenă în prezentul test.

Deși majoritatea experimentelor vor da în mod clar rezultate pozitive sau negative, în cazuri rare datele stabilite vor exclude posibilitatea unei concluzii definitive cu privire la activitatea substanței de testat. Rezultatele pot să rămână nesigure sau discutabile, independent de numărul de experimente.

Rezultatele pozitive ale testului de micronucleu indică faptul că substanța induce formarea de micronuclee ca urmare a leziunilor cromozomiale sau leziunilor aparatului mitotic din eritroblaștii speciei testate. Rezultatele negative indică faptul că, în condițiile experimentale, substanța de testat nu produce micronuclee în eritrocitele imature ale speciei testate.

Ar trebui să fie discutată probabilitatea ca substanța de testat sau metaboliții acesteia să ajungă în circulația generală sau în mod specific în țesutul-țintă (de ex. toxicitatea sistemică).

3. RAPORTAREA

RAPORTUL TESTULUI

Raportul testului ar trebui să conțină următoarele informații:

Solventul/vehiculul:

— justificarea alegerii vehiculului;

— solubilitatea și stabilitatea substanței de testat în solvent/vehicul, dacă se cunoaște.

Animalele de laborator:

- specia/sușa utilizată;
- numărul, vârsta și sexul animalelor;
- sursa, condițiile de adăpost și hrană etc.;
- greutatea fiecărui animal la începutul testului, inclusiv intervalul de greutate, greutatea medie și deviația standard pentru fiecare grupă.

Condițiile de testare:

- martorii pozitivi și negativi (solvent/vehicul);
- datele din studiul pentru stabilirea dozelor, dacă s-a realizat;
- justificarea alegerii dozelor utilizate;
- detalii privind prepararea substanței de testat;
- detalii privind administrarea substanței de testat;
- justificarea căii de administrare selectate;
- metodele de verificare pentru a constata dacă substanța de testat a ajuns în circulația generală sau în țesutul-țintă, dacă este cazul;
- conversia concentrației substanței de testat (ppm) în hrană/apa de băut în doză reală (mg/kg greutate corp/zi), dacă este cazul;
- detalii privind calitatea hranei și a apei;
- descrierea amănunțită a modalităților de tratare și de prelevare a probelor;
- metodele de preparare a lamelelor;
- metodele de măsurare a toxicității;
- criteriile pentru numărătoarea eritrocitelor imature micronucleate;
- numărul de celule analizate per animal;
- criteriile utilizate la caracterizarea studiilor ca fiind pozitive, negative sau nesigure.

Rezultatele:

- semnele de toxicitate;
- proporția de eritrocite imature în raport cu numărul total de eritrocite;
- numărul de eritrocite imature micronucleate, prezentat separat pentru fiecare animal;
- media \pm deviația standard pentru eritrocitele imature micronucleate pentru fiecare grupă;
- relația doză-răspuns, dacă este posibil;
- analizele statistice și metodele aplicate;
- datele privind martorii negativi studiați în paralel și anterior testului;
- datele privind martorii pozitivi studiați în paralel.

Discutarea rezultatelor.

Concluziile.

4. **BIBLIOGRAFIA**

- (1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, pp. 187-190.
- (2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 9-15.
- (3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. and Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res.* 123, pp. 61-118.
- (4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990), The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, pp. 29-80.
- (5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N. and Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: *Developments in Science and Practice of Toxicology*, ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya. Elsevier, Amsterdam, pp. 555-558.
- (6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A. Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C., Salamone, M. F., Tice, R. R., and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.*, 189, pp. 103-112.
- (7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R. and Shelby, M. E. (1990), The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, *Fund. Appl. Toxicol.* 14, pp. 513-522.
- (8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofumi, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, *Mutation Res.*, 245, pp. 245-249.
- (9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS, MMS, *Mutation Res.*, 278, pp. 83-98.
- (10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995), Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 53-159.
- (11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchicrotti, F., Romagna, F., Shimada, H. Sutou, S. and Vannier, B. (1994), *In Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res.*, 312, pp. 293-304.
- (12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 313-319.
- (13) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
- (14) Hayashi, M., Sofumi, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, pp. 241-247.
- (15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyromin Y, *Mutation Res.*, 120, pp. 269-275.
- (16) Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 213, pp. 91-104.
- (17) Gollapudi, B. and McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, pp. 97-99.
- (18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetics Assay, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity tests, UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part 1, revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232."

ANEXA 4D

„B.13/14. MUTAGENITATEA – TESTUL DE MUTAȚIE INVERSĂ PE BACTERII**1. METODA**

Prezenta metodă este reprodusă după orientarea OCDE TG 471, Testul de mutație inversă pe bacterii (1997).

1.1. INTRODUCERE

Testul bacterian de mutație inversă se bazează pe sușe de *Salmonella typhimurium* și *Escherichia coli*, care necesită aminoacizi, și urmărește detectarea mutațiilor punctiforme, care includ substituția, adăugarea sau deleția uneia sau a câtorva perechi de bază din ADN (1) (2) (3). Principiul prezentului test bacterian de mutație inversă constă în detectarea mutațiilor care reîntorc mutațiile, prezente în sușele experimentale, în starea inițială și refac funcționalitatea bacteriilor de a sintetiza un aminoacid esențial. Bacteriile de inversare se detectează datorită capacității lor de a se dezvolta în absența aminoacidului necesar pentru sușa parentală experimentală.

Mutațiile punctiforme sunt cauza multor maladii genetice umane și există dovezi substanțiale că mutațiile din oncogene și genele supresoare de tumori din celulele somatice sunt implicate în formarea tumorilor la oameni și animalele de laborator. Testul bacterian de mutație inversă este rapid, ieftin și relativ ușor de realizat. Multe dintre sușele experimentale au câteva particularități care le fac mai sensibile pentru detectarea de mutații, inclusiv secvențe de ADN sensibile la mutații în locurile de inversare, permeabilitate celulară crescută pentru moleculele mari și eliminarea sistemelor de regenerare a ADN sau intensificarea proceselor care au tendința să inducă erori în timpul regenerării ADN. Specificitatea sușelor experimentale poate să furnizeze informații utile privind tipurile de mutații care sunt induse de către agenții genotoxici. O bază de date cu un număr mare de rezultate, pentru structuri foarte variate, este disponibilă pentru testele bacteriene de mutații inverse și au fost elaborate metodologii bine stabilite pentru testarea produselor chimice cu diferite proprietăți fizico-chimice, inclusiv a compușilor volatili.

A se vedea introducerea generală din partea B.

1.2. DEFINIȚII

Un test de mutație inversă, fie la *Salmonella typhimurium*, fie la *Escherichia coli*, detectează mutația într-o sușă care necesită un aminoacid (histidină sau respectiv triptofan) pentru a produce o sușă independentă de aportul exterior de aminoacid.

Mutageni care provoacă substituția perechilor de bază sunt agenți care provoacă substituția unei baze din ADN. Într-un test de reversie, acest tip de modificare poate să se producă la locul mutației inițiale sau într-un al doilea loc în genomul bacterian.

Mutageni de decalare a cadrului de citire sunt agenți care produc adăugarea sau deleția uneia sau a mai multor perechi de bază din ADN, modificând astfel cadrul de citire în ARN.

1.3. CONSIDERAȚII PRELIMINARE

Testul bacterian de mutație inversă utilizează celule procariote, care diferă de celulele mamiferelor în privința absorbției, metabolismului, structurii cromozomilor și proceselor de regenerare a ADN. Pentru testele realizate *in vitro* este necesară în general o sursă exogenă de activare metabolică. Sistemele de activare metabolică *in vitro* nu pot să reproducă în totalitate condițiile metabolismului celulelor de mamifere *in vivo*. Testul nu furnizează, prin urmare, informații directe privind capacitatea mutagenă și cancerigenă a unei substanțe la mamifere.

Testul bacterian de mutație inversă se utilizează, de obicei, pentru o primă triere a activității genotoxice, în special pentru detectarea mutației punctiforme. O bogată bază de date demonstrează că multe produse chimice care dau rezultate pozitive în prezentul test prezintă activitate mutagenă și în alte teste. Există exemple de agenți mutageni care nu se detectează prin acest test; aceste deficiențe se pot explica prin natura

specifică a efectului detectat, activarea metabolică diferită sau biodisponibilitatea diferită. Pe de altă parte, factorii care cresc sensibilitatea testului bacterian de mutație inversă pot să conducă la o supraestimare a activității mutagene.

S-ar putea ca testul bacterian de mutație inversă să nu fie potrivit pentru evaluarea anumitor clase de substanțe chimice, de exemplu, compuși cu acțiune bactericidă puternică (de ex. anumite antibiotice) sau cei despre care se consideră (sau se știe) că interferează în mod specific cu sistemele de replicare a celulelor de mamifere (de ex. unii inhibitori de topoizomerază și unii analogi de nucleozide). În aceste cazuri, s-ar putea ca testele de mutație pe celule de mamifere să fie mai potrivite.

Deși mulți compuși care dau rezultate pozitive în prezentul test sunt cancerigeni pentru mamifere, corelația nu este absolută. Aceasta depinde de clasa de substanțe chimice și există agenți cancerigeni care nu se detectează cu prezentul test, deoarece acționează prin alte mecanisme negenotoxice sau mecanisme care nu sunt prezente în celulele bacteriene.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Suspensiile de celule bacteriene sunt expuse la substanța de testat în prezența și în absența unui sistem exogen de activare metabolică. În procedeele de încorporare prin depunere pe o placă, suspensiile menționate se amestecă cu o geloză de acoperire (agar) și se depun imediat pe un mediu minimal. În procedeele de preincubare, amestecul de tratare se încubează și apoi se amestecă cu geloză de acoperire înaintea depunerii pe un mediu minim. Pentru ambele metode, după două sau trei zile de incubare, coloniile care produc inversarea se numără și numărul obținut se compară cu cel al coloniilor spontane de inversare aflate pe plăci cu martor tratate cu solvent.

Sunt descrise câteva proceduri pentru realizarea testului bacterian de mutație inversă. Printre cele utilizate în mod curent sunt metoda de încorporare prin depunere (1) (2) (3) (4), metoda cu preincubare (2) (3) (5) (6) (7) (8), metoda fluctuației (9) (10) și metoda cu suspensie (11). Sunt descrise modificări pentru testarea substanțelor în stare gazoasă sau de vapori (12).

În prezenta metodă se descrie modul de lucru pentru procedeele de încorporare prin depunere și pentru cel cu preincubare. Oricare dintre acestea se poate accepta pentru realizarea experimentelor, atât cu activare metabolică, cât și fără aceasta. Pentru unele substanțe, este mai eficientă detectarea prin procedeele cu preincubare. Substanțele respective aparțin unor clase chimice care includ nitrozamine alifatiche cu lanț scurt, metale bivalente, aldehide, coloranți azoici și diazoderivații, alcaloizi ai pirolizidinei, compuși alchilici și nitroderivați (3). De asemenea, se admite că unele clase de mutageni nu se detectează întotdeauna prin procedeele standard, ca încorporarea prin depunere sau procedeele cu incubare. Ar trebui să se considere că acestea sunt «cazuri izolate» și se recomandă cu tărie utilizarea unor procedee alternative pentru detectarea lor. Din categoria «cazuri izolate» este posibilă identificarea (împreună cu exemple de procedeele care se pot utiliza pentru detectarea acestora) a următoarelor cazuri: coloranți azoici și compuși diazoici (3) (5) (6) (13), cei în stare gazoasă și volatili (12) (14) (15) (16) și glicozidele (17) (18). Orice deviație de la procedura standard necesită o justificare științifică.

1.5. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.5.1. **Preparatele**

1.5.1.1. *Bacteriile*

Culturile proaspete de bacterii ar trebui lăsate să se dezvolte până la finalul fazei exponențiale sau debutul fazei staționare de creștere (aproximativ 10^9 celule pe ml). Culturile aflate în faza staționară finală nu ar trebui să se utilizeze. Este esențial ca în experiment să se utilizeze culturi cu titru mare de bacterii viabile. Titrul se poate determina fie plecând de la datele anterioare privind curbele de creștere a culturilor martor, fie pentru fiecare test, prin determinarea numărului de celule viabile prin etalare.

Temperatura de incubare recomandată este de 37 °C.

Se recomandă utilizarea a minimum cinci sușe de bacterii. Acestea ar trebui să includă patru sușe de *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 sau TA97a sau TA97; TA98 și TA100) pentru care comparațiile între laboratoare au indicat că sunt fiabile și dau răspunsuri reproductibile. Cele patru sușe de *S. typhimurium* menționate posedă perechi de bază GC în primul situs de reversie și se cunoaște că acestea nu pot să detecteze anumiți agenți mutageni oxidanți, agenți de reticulare și unele hidrazine. Detectarea acestor substanțe este posibilă cu ajutorul sușelor de *E. coli* WP2 sau de *S. typhimurium* TA102 (19) care posedă o pereche de bază AT în situsul primar de reversie. Combinația de sușe recomandată este, prin urmare, următoarea:

- *S. typhimurium* TA1535;
- *S. typhimurium* TA1537 sau TA97 sau TA97a;
- *S. typhimurium* TA98;
- *S. typhimurium* TA100;
- *E. coli* WP2 uvrA sau *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) sau *S. typhimurium* TA102.

Pentru detectarea agenților mutageni de reticulare s-ar putea prefera includerea sușei TA102 sau adăugarea unei sușe de *E. coli* capabile de regenerarea ADN [de ex. *E. coli* WP2 sau *E. coli* WP2 (pKM101)].

Ar trebui să se utilizeze procedurile stabilite pentru prepararea culturilor de rezervă, verificarea markerilor și pentru păstrare. Pentru fiecare preparat de cultură de rezervă congelată, ar trebui să se demonstreze necesitatea prezenței unui aminoacid pentru dezvoltarea culturii (histidină pentru sușele *S. typhimurium* și triptofan pentru sușele *E. coli*). Ar trebui să se verifice și alte caracteristici ale fenotipului, de ex. prezența sau absența plasmidelor factorului R (rezistență), dacă este cazul [adică rezistența la ampicilină a sușelor TA98, TA100, TA97a sau TA97, WP2 uvrA și WP2 uvrA (pKM101) și rezistența la ampicilină + tetraciclină a sușei TA102]; prezența mutațiilor caracteristice (adică mutația *rfa* în *S. typhimurium* prin sensibilizare la cristal violet și mutația *uvrA* în *E. coli* sau mutația *uvrB* în *S. typhimurium* prin sensibilizare la lumina ultravioletă) (2) (3). De asemenea, sușele ar trebui să producă un număr de colonii spontane de reversie pe fiecare placă, între limitele de frecvență estimate pe baza datelor de laborator anterioare și, de preferință, între limitele semnalate în literatura de specialitate.

1.5.1.2. Mediul

Se utilizează o geloză minimală corespunzătoare (de ex. una care conține mediu minimal E Vogel-Bonner și glucoză) și o geloză de acoperire care conține histidină și biotin sau triptofan pentru a permite divizarea doar a unui număr mic de celule (1) (2) (9).

1.5.1.3. Activarea metabolică

Expunerea bacteriilor la substanța de testat ar trebui să se realizeze atât în prezența, cât și în absența unui sistem corespunzător de activare metabolică. Sistemul utilizat cel mai frecvent conține o fracție postmitocondrială îmbogățită cu un cofactor (S9), preparată din ficat de rozătoare tratat cu agenți de inducție enzimatică, de ex. Aroclor 1254 (1) (2) sau un amestec de fenobarbitonă și β-naftoflavonă (18) (20) (21). Frația postmitocondrială se utilizează, de obicei, la concentrații cuprinse între 5 și 30 % vol./vol. în amestecul S9. Alegerea și compoziția unui sistem de activare metabolică pot să depindă de clasa chimică a substanței de testat. În unele cazuri, s-ar putea să fie convenabilă utilizarea mai multor concentrații ale fracției postmitocondriale. Pentru coloranții azoici și diazoderivați, s-ar putea să fie mai potrivită utilizarea unui sistem de activare metabolică reducător (6) (13).

1.5.1.4. Substanța de testat/prepararea

Substanțele de testat în stare solidă ar trebui să se prepare sub formă de soluții sau suspensii în solvenții sau vehiculele corespunzătoare, care, dacă este cazul, se diluează înaintea tratamentului bacteriilor. Substanțele de testat lichide se pot adăuga direct în sistemele de testare și se diluează înainte de utilizare în tratamentul bacteriilor. Se recomandă utilizarea preparatelor proaspete de substanță de testat, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora în caz de păstrare.

Solventul/vehiculul nu ar trebui să reacționeze chimic cu substanța de testat și nu ar trebui să afecteze supraviețuirea bacteriilor și activitatea S9 (22). Utilizarea altor solvenți/vehicule decât cele recunoscute ar trebui să fie justificată cu date care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se prefere utilizarea unui solvent/vehicul apos. Când se testează substanțe instabile în apă, solventul organic utilizat ar trebui să nu conțină apă.

1.5.2. Condițiile de testare

1.5.2.1. Sușele experimentale (a se vedea 1.5.1.1)

1.5.2.2. Concentrația de expunere

Printre criteriile care trebuie luate în considerație la determinarea cantității maxime de substanță de testat ce urmează să se utilizeze sunt citotoxicitatea și solubilitatea în amestecul final de tratare.

Ar putea fi util un test preliminar pentru determinarea toxicității și caracteristicilor de solubilitate. Detectarea citotoxicității poate fi posibilă printr-o reducere a numărului de colonii care provoacă reversia, o clarificare și diminuare a fondului de bacterii sau a gradului de supraviețuire a culturilor tratate. Prezența sistemelor de activare metabolică poate să influențeze citotoxicitatea unei substanțe. Insolubilitatea ar trebui să fie evaluată prin formarea în amestecul final, în condiții de testare reale, a unui precipitat vizibil cu ochiul liber.

Concentrația de testare maximă recomandată pentru substanțele necitotoxice solubile este de 5 mg/placă sau 5 μl/placă. Pentru substanțele necitotoxice insolubile la 5 mg/placă sau 5 μl/placă, una sau mai multe din concentrațiile de testare ar trebui să fie insolubile în amestecul final de tratament. Pentru substanțele de testat care sunt deja citotoxice la concentrații mai mici de 5 mg/placă sau 5 μl/placă, testarea ar trebui să se realizeze până la o concentrație citotoxică. Ar trebui ca precipitatul să nu interfereze cu evaluarea rezultatelor.

Într-un test inițial, se recomandă utilizarea unui număr minim de cinci concentrații analizabile diferite, cu intervale între punctele de testare de aproximativ o semiunitate logaritmică (adică $\sqrt{10}$). Pentru stabilirea unei relații concentrație-răspuns, intervale menționate mai reduse ar putea fi mai adecvate. Când se evaluează substanțe cu un conținut substanțial de posibile impurități mutagene, s-ar putea avea în vedere testarea la concentrații mai mari de 5 mg/placă sau 5 μl/placă.

1.5.2.3. Martorii negativi și pozitivi

Martorii pozitivi specifici sușei și martorii negativi (solvent sau vehicul) utilizați în paralel ar trebui să se includă în fiecare test, atât în prezența, cât și în absența activării metabolice. Pentru martorii pozitivi, ar trebui să fie selectate acele concentrații care permit să se demonstreze eficiența testului realizat.

Pentru testele care utilizează un sistem de activare metabolică, selectarea substanței sau substanțelor de referință pentru martorii pozitivi ar trebui să se realizeze în funcție de tipul sușelor bacteriene utilizate.

În tabelul următor sunt prezentate exemple de substanțe care se pot utiliza ca martori pozitivi pentru testele cu activare metabolică:

Substanța	Nr. CAS	Nr. IESCE
9,10-dimetilantracen	781-43-1	212-308-4
7,12-dimetilbenz[a]antracen	57-97-6	200-359-5
benzo[a]piren	50-32-8	200-028-5
2-aminoantracen	613-13-8	210-330-9
ciclofosamidă	50-18-0	200-015-4
ciclofosamidă monohidrat	6055-19-2	

Următoarea substanță este un martor pozitiv adecvat pentru metoda de activare metabolică reductivă:

Substanța	Nr. CAS	Nr. IESCE
Roșu de Congo	573-58-0	209-358-4

2-aminoantracenu nu ar trebui să se utilizeze ca indicator unic al eficienței amestecului S9. Dacă se utilizează 2-aminoantracenu, fiecare lot de S9 ar trebui să fie, de asemenea, caracterizat cu un mutagen care necesită o activare metabolică de către enzimele microzomiale, de ex. benzo[a]pirenului, dimetilbenzantracenu.

În tabelul următor sunt prezentate exemple de substanțe care se pot utiliza ca martori pozitivi specifici sușei pentru testele realizate fără un sistem de activare metabolică exogenă:

Substanța	Nr. CAS	Nr. IESCE	Sușa
azidă de sodiu	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 și TA 100
2-nitrofluoren	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoacridină	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 și TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 și TA 97a
hidroperoxid de cumenă	80-15-9	201-254-7	TA 102
mitomicin C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA și TA 102
N-etil-N-nitro-N-nitrozoguanidină	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2 uvrA și WP2uvrA(pKM101)
4-nitrochinolină-1-oxid	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2 uvrA și WP2uvrA(pKM101)
furilfuramidă (AF2)	3688-53-7		Sușe cu conținut de plasmid

Se pot utiliza și alte substanțe de referință ca martori pozitivi corespunzători. Ar trebui să se aibă în vedere utilizarea unor martori pozitivi din aceeași clasă chimică, dacă sunt disponibili.

Ar trebui să se utilizeze martori negativi, constituiți din solvent sau vehiculul fără substanța de testat, dar tratați în același mod ca grupele cu tratament. În plus, ar trebui să se utilizeze și martori netratați, cu excepția cazului în care există date din testele anterioare care să ateste că solventul ales nu are efecte dăunătoare sau mutagene.

1.5.3. Modul de lucru

Pentru metoda de încorporare prin depunere pe o placă (1) (2) (3) (4), fără activare metabolică, se prepară, de obicei, un amestec din 0,05 ml sau 0,1 ml de soluție de testat, 0,1 ml de cultură bacteriană proaspătă (ce conține aproximativ 10^8 celule viabile) și 0,5 ml de tampon steril cu 2,0 ml geloză de acoperire (agar). Pentru testul cu activare metabolică, se prepară, de obicei, un amestec din 0,5 ml preparat de activare metabolică, ce conține o cantitate specifică de fracție postmitocondrială (în proporție de 5 până la 30 % vol./vol. în preparatul de activare metabolică), 2,0 ml de geloză de acoperire, bacterii și substanța de testat/soluția de testat. Conținutul din fiecare eprubetă se agită și se toarnă pe suprafața unui mediu minimal de geloză deșus pe placă. Geloză de acoperire se lasă să se solidifice înainte de incubare.

Pentru metoda de preincubare (2) (3) (5) (6), substanța de testat/soluția de testat se supune la preincubare împreună cu sușa experimentală (ce conține aproximativ 10^8 celule viabile) și cu tamponul steril sau sistemul de activare metabolică (0,5 ml) de obicei timp de 20 de minute sau mai mult, la 30-37 °C, înainte de a fi amestecată cu geloză de acoperire și turnată pe suprafața unui mediu minimal de geloză deșus pe placă. De obicei, se prepară un amestec din 0,05 ml sau 0,1 ml de substanță de testat/soluție de testat, 0,1 ml bacterii și 0,5 ml amestec S9 sau tampon steril cu 2,0 ml geloză de acoperire. Eprubetele ar trebui să fie aerate cu ajutorul unui agitator în timpul preincubării.

Pentru o bună estimare a variației, ar trebui să se utilizeze câte trei plăci cu depuneri pentru fiecare doză. Se acceptă utilizarea a doar două plăci cu depuneri, dacă se justifică științific acest lucru. Pierderea ocazională a unei plăci nu invalidează în mod necesar testul.

Substanțele în stare gazoasă sau cele volatile ar trebui să fie testate în condiții corespunzătoare, de ex. în vase închise ermetic (12) (14) (15) (16).

1.5.4. Incubarea

Toată plăcile dintr-un test dat ar trebui să fie incubate la 37 °C timp de 48-72 de ore. După incubare, se procedează la număratoarea coloniilor care provoacă reversia de pe fiecare placă.

2. DATELE

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Datele ar trebui să se prezinte sub forma numărului de colonii care provoacă reversia de pe fiecare placă. De asemenea, ar trebui să se prezinte numărul de colonii care provoacă reversie, atât pe plăcile cu martor negativ (martor solvent și martor netratat, dacă s-a utilizat), cât și pentru plăcile cu martor pozitiv. Ar trebui să se prezinte număratoarea pentru fiecare placă, numărul mediu de colonii care provoacă reversia pentru fiecare placă și deviația standard pentru substanța de testat și pentru martorii pozitivi și negativi (netratați și solvent).

Nu este necesară verificarea unui răspuns clar pozitiv. Rezultatele nesigure ar trebui să fie clarificate prin teste suplimentare, realizate de preferință prin modificarea uneia dintre condițiile experimentale. Rezultatele negative necesită confirmare pentru fiecare caz. În cazurile în care se consideră că nu este necesară confirmarea rezultatelor negative, ar trebui să se ofere o justificare. Pentru testele de confirmare ar trebui să se aibă în vedere modificarea condițiilor experimentale pentru lărgirea gamei de condiții evaluate. Condițiile experimentale care ar putea fi modificate includ diferența dintre concentrații, metoda de tratament (încorporarea prin depunere pe placă sau preincubarea în mediu lichid) și condițiile de activare metabolică.

2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Există câteva criterii pentru determinarea unui rezultat pozitiv, precum creșterea în funcție de concentrație peste intervalul testat și o creștere reproductibilă a uneia sau mai multor concentrații ale numărului de colonii care provoacă reversia per placă, la cel puțin o sușă cu sau fără sistem de activare metabolică (23). În primul rând ar trebui să se aibă în vedere relevanța biologică a rezultatelor. Pentru evaluarea rezultatelor testelor se poate recurge și la ajutorul unor metode statistice (24). Semnificația statistică nu ar trebui să fie totuși singurul factor determinant pentru a decide cu privire la un răspuns pozitiv.

Dacă rezultatele pentru o substanță de testat nu îndeplinesc criteriile menționate anterior, substanța respectivă se consideră a fi nemutagenă în prezentul test.

Deși majoritatea experimentelor vor da în mod clar rezultate pozitive sau negative, în unele cazuri rare datele stabilite vor exclude posibilitatea unei concluzii definitive cu privire la activitatea substanței de testat. Rezultatele pot să rămână nesigure sau discutabile, independent de numărul de experimente.

Rezultatele pozitive ale unui test de mutație bacteriană inversă indică faptul că substanța de testat induce mutații punctiforme prin substituirea bazelor sau decalarea cadrului de citire în genomul de *Salmonella typhimurium* și *Escherichia coli*. Rezultatele negative indică faptul că, în condiții experimentale, substanța de testat nu este mutagenă pentru speciile testate.

3. RAPORTAREA

RAPORTUL TESTULUI

Raportul testului trebuie să conțină următoarele informații:

Solventul/vehiculul:

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

Sușele:

- sușele utilizate;
- numărul de celule per cultură;
- caracteristicile sușei.

Condițiile de testare:

- cantitatea de substanță de testat per placă (mg/placă sau µl/placă) cu justificarea alegerii dozei și numărului de plăci per concentrație;
- mediile utilizate;
- tipul și compoziția sistemului de activare metabolică, inclusiv criteriile de acceptabilitate;
- procedurile de tratament.

Rezultatele:

- semnele de toxicitate;
- semnele de precipitare;
- numărătoarea pentru fiecare placă;
- numărul mediu de colonii care provoacă reversia pentru fiecare placă și deviația standard;
- relația doză-răspuns, dacă este posibil;
- analizele statistice, dacă există;
- datele privind martorii negativi (solvent/vehicul) și pozitivi studiați în paralel, cu domenii, valori medii și deviații standard;
- datele privind martorii negativi (solvent/vehicul) și pozitivi studiați anterior, cu domenii, valori medii și deviații standard.

Discutarea rezultatelor.

Concluziile.

4. BIBLIOGRAFIA

- (1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods of Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
- (3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, pp. 217-233.
- (4) Kier, L. D., Brusick D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 168, pp. 69-240.
- (5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters* 1, pp. 91-96.
- (6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*, ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.
- (7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster, R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised*, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.
- (8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety*, 8, pp. 167-177.

- (9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutation Res.*, 38, pp. 33-42.
 - (10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.
 - (11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, *Environmental Mutagenesis*, 3, pp. 453-465.
 - (12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.*, 307, pp. 335-344.
 - (13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified *Salmonella* Assay, *Mutation Res.*, 136, pp. 33-47.
 - (14) Zeiger, E., Anderson, B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), *Salmonella* Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, pp. 2-141.
 - (15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.
 - (16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames /*Salmonella* Assay, *Environmental Mutagenesis*, 9, pp. 421-441.
 - (17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, *Cancer Res.*, 39, pp. 3780-3782.
 - (18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, pp. 4961-4965.
 - (19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis*, 5, pp. 285-291.
 - (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.
 - (21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
 - (22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the *Salmonella*/Microsome Test, *Mutation Res.*, 88, pp. 343-350.
 - (23) Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res.*, 189, pp. 83-91.
 - (24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchel, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28-65.
-

ANEXA 4E

„B.17. MUTAGENITATEA – TEST IN VITRO DE MUTAȚIE GENICĂ PE CELULE DE MAMIFERE**1. METODA**

Prezenta metodă este reprodusă după orientarea OCDE TG 476, Testul *in vitro* de mutație genică pe celule de mamifere (1997).

1.1. INTRODUCERE

Testul *in vitro* de mutație genică pe celule de mamifere se poate utiliza pentru detectarea mutațiilor genice produse de substanțele chimice. Liniile celulare corespunzătoare conțin celule de limfom de șoarece L5178Y, liniile CHO, CHO-AS52 și V79 de celule de hamster chinezesc și celule limfoblastoide umane TK6 (1). În liniile celulare menționate, efectele genetice cel mai frecvent măsurate sunt o mutație în pozițiile timidin kinază (TK) și hipoxantin-guanină fosforibozil transferază (HPRT), precum și o transgenă de xantin-guanină fosforibozil transferază (XPRT). Testele de mutație TK, HPRT și XPRT permit detectarea diferitelor spectre ale diferitelor fenomene genetice. Amplasarea autozomică a TK și XPRT poate să permită detectarea fenomenelor genetice (de ex. deleții importante) care nu sunt detectate în locusul HPRT la cromozomii X (2) (3) (4) (5) (6).

În testul *in vitro* de mutație genică pe celule de mamifere, se pot utiliza culturi de linii celulare stabilite sau sușe celulare. Celulele utilizate se selectează în funcție de capacitatea de creștere în cultură și de stabilitatea frecvenței de mutație spontană.

Testele realizate *in vitro* necesită, în general, utilizarea unei surse exogene de activare metabolică. Sistemul de activare metabolică de acest tip nu poate să reproducă integral condițiile celulelor de mamifere *in vivo*. Ar trebui să se acorde atenție evitării condițiilor care ar putea să conducă la obținerea unor rezultate care nu reflectă o mutagenitate intrinsecă. Rezultatele pozitive care reflectă o mutagenitate intrinsecă ar putea să provină în urma modificărilor de pH, de osmolalitate sau din valori mari ale citotoxicității (7).

Prezentul test se utilizează la depistarea substanțelor cu posibile efecte mutagene și cancerigene pentru mamifere. Mulți compuși care dau rezultate pozitive la acest test sunt cancerigeni pentru mamifere; cu toate acestea, nu există o corelație perfectă între prezentul test și cancerigenitate. Corelația depinde de clasa chimică și sunt tot mai multe dovezi cu privire la existența unor agenți cancerigeni care nu se depistează prin prezentul test, deoarece este posibil ca aceștia să acționeze prin alte mecanisme, negenotoxice sau mecanisme absente în celulele bacteriene (6).

A se vedea și introducerea generală din partea B.

1.2. DEFINIȚII

Mutație directă: o mutație a genelor de la forma originală la forma mutantă care generează o reducere a activității enzimatică din funcția proteinei codificate.

Mutageni care provoacă substituția perechilor de bază: substanțe care produc substituția uneia sau mai multor perechi de bază din ADN.

Mutageni de decalare a cadrului de citire: substanțe care produc adăugarea sau deleția uneia sau a mai multor perechi de bază din molecula de ADN.

Timpul de manifestare a fenotipului: timpul în care produsele nemodificate ale genelor sunt epuizate din celulele care au suferit o nouă mutație.

Frecvența mutantului: numărul de celule mutante observate împărțit la numărul de celule viabile.

Creștere totală relativă: creșterea numărului de celule în timp, în raport cu populația de celule martor; se calculează ca produsul dintre creșterea în suspensie în raport cu martorul negativ și eficacitatea clonării în raport cu martorul negativ.

Creștere relativă în suspensie: creșterea numărului de celule în timpul de manifestare în raport cu martorul negativ.

Viabilitate: eficacitatea clonării celulelor tratate în momentul depunerii pe placă în condiții selective după perioada de manifestare.

Supraviețuire: eficacitatea clonării celulelor tratate atunci când sunt depuse pe placă la încheierea perioadei de tratament; supraviețuirea se exprimă în raport cu supraviețuirea populației de celule martor.

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Celulele cu deficit de timidin chinază (TK) datorită mutației $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ sunt rezistente la efectele citotoxice ale trifluorotimidinei (TFT), un analog al pirimidinei. Celulele care posedă timidin chinază sunt sensibile la TFT, care produce inhibarea metabolismului celular și întrerupe diviziunea celulară. Prin urmare, celulele mutante pot să prolifereze în prezența TFT, în timp ce celulele normale, care conțin timidin chinază, nu pot. În mod similar, celulele cu deficit de HPRT sau XPRT sunt selectate în funcție de rezistența la 6-tioguanină (TG) sau 8-azaguanină (AG). Dacă analogul unei baze sau un compus înrudit cu agentul selectiv este supus la unul dintre testele de mutație genică pe celule de mamifere, proprietățile substanței de testat trebuie studiate cu grijă. De exemplu, ar trebui să se examineze substanța de testat suspectată de toxicitate selectivă pentru celule mutante și nemutante. În consecință, performanța sistemului/agentului de selecție trebuie să fie confirmată atunci când se testează substanțe chimice cu o structură apropiată de cea a agentului selectiv (8).

Celulele în suspensie sau în cultură monostrat se expun o perioadă de timp corespunzătoare la substanța de testat atât în prezența, cât și în absența activării metabolice și se reînsămânțează pentru determinarea citotoxicității și pentru a permite manifestarea fenotipului înaintea selecției mutantului (9) (10) (11) (12) (13). Citotoxicitatea se determină, de obicei, prin măsurarea eficacității clonării relative (supraviețuirii) sau a creșterii totale relative a culturilor după perioada de tratament. Culturile tratate sunt menținute în mediul de cultură un timp suficient, caracteristic pentru fiecare locus și tip de celulă selectate, pentru a permite o manifestare fenotipică aproape optimă a mutațiilor induse. Frecvența mutantilor se determină prin însămânțarea unui număr cunoscut de celule într-un mediu ce conține agentul selectiv pentru a detecta celulele mutante și într-un mediu fără agent selectiv pentru a determina eficacitatea clonării (viabilitatea). După un timp corespunzător de incubare, se numără coloniile. Frecvența mutantului se determină prin compararea numărului de colonii de mutanți în mediul selectiv cu numărul de colonii în mediul neselectiv.

1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.4.1. Preparatele

1.4.1.1. Celulele

Există diferite tipuri de celule care se pot utiliza în prezentul test, inclusiv subclonele de celule L5171Y, CHO, CHO-AS52, V79 sau TK6. Tipurile de celule utilizate în prezentul test ar trebui să aibă o sensibilitate dovedită la mutageni chimici, o eficacitate mare de clonare și o frecvență de mutație spontană stabilă. Ar trebui să se verifice contaminarea cu micoplasmă a celulelor și, dacă se constată că sunt contaminate, nu ar trebui să se utilizeze.

Testul ar trebui conceput astfel încât să aibă o sensibilitate și putere predeterminate. Numărul de celule, culturi și concentrațiile substanței de testat utilizate ar trebui să reflecte parametrii definiți anterior (14). Numărul minim de celule viabile care supraviețuiesc tratamentului și se utilizează în fiecare stadiu al testului ar trebui să fie în funcție de frecvența mutației spontane. O regulă generală constă în utilizarea unui număr de celule cel puțin egal cu de 10 ori inversul frecvenței de mutație spontană. Cu toate acestea, se recomandă utilizarea a minimum 10^6 celule. Pentru a asigura o performanță constantă a testului, ar trebui să se dispună de date anterioare specifice privind sistemul celular utilizat.

1.4.1.2. Mediile și condițiile de cultură

Se recomandă utilizarea mediilor de cultură și a condițiilor de incubare (vasele de cultură, temperatura, concentrația CO_2 și umiditatea) corespunzătoare. Alegerea mediilor ar trebui să se facă în funcție de sistemele selective și de tipul celulelor utilizate în test. O importanță deosebită o prezintă alegerea condițiilor de cultură, astfel încât să asigure creșterea optimă a celulelor în perioada de manifestare și capacitatea celulelor, atât mutante, cât și nemutante, de a forma colonii.

1.4.1.3. *Prepararea culturilor*

Celulele se obțin plecând de la culturile de rezervă, se însămânțează în mediul de cultură și se incubează la 37 °C. Înainte de a fi utilizate în prezentul test, este necesară curățarea culturilor de celulele mutante preexistente.

1.4.1.4. *Activarea metabolică*

Se recomandă ca expunerea celulelor la substanța de testat să se realizeze atât în prezența, cât și în absența unui sistem de activare metabolică corespunzător. Sistemul cel mai frecvent utilizat este o fracție postmitocondrială la care s-au adăugat cofactori (S9), preparată din ficat de rozătoare tratat cu agenți de inducție enzimatică, de ex. Aroclor 1254 (15) (16) (17) (18) sau un amestec de fenobarbitonă și β-naftoflavonă (19) (20).

Fracția postmitocondrială se utilizează, de obicei, la concentrații cuprinse între limitele 1-10 % vol./vol. în mediul de testare final. Selectarea și tipul unui sistem de activare metabolică pot să depindă de clasa chimică a substanței de testat. În unele cazuri, ar putea fi convenabilă utilizarea mai multor concentrații ale fracției postmitocondriale.

O serie de realizări, inclusiv crearea prin inginerie genetică a unor linii celulare care exprimă enzime activatoare specifice, pot să furnizeze potențialul pentru o activare endogenă. Alegerea liniilor celulare ar trebui să fie justificată din punct de vedere științific (de ex. prin importanța izoenzimei citocromului P450 pentru metabolismul substanței de testat).

1.4.1.5. *Prepararea substanței de testat*

Substanțele de testat în stare solidă ar trebui să se prepare sub formă de soluții sau suspensii în solvenții sau vehiculele corespunzătoare, care, dacă este cazul, se diluează înainte de tratamentul celulelor. Substanțele de testat lichide se pot adăuga direct în sistemele de testare și se diluează înainte de utilizare în tratamentul celulelor. Se recomandă utilizarea preparatelor proaspete de substanță de testat, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora la păstrare.

1.4.2. **Condițiile de testare**

1.4.2.1. *Solventul/vehiculul*

Solventul/vehiculul ar trebui să fie ales astfel încât să nu existe suspiciunea reacției chimice a acestuia cu substanța de testat și să nu afecteze negativ supraviețuirea celulelor și activitatea S9. Utilizarea altor solvenți/vehicule decât cele recunoscute ar trebui să se justifice cu date care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se prefere un solvent/vehicul apos. La testarea substanțelor instabile în apă, solventul organic utilizat nu ar trebui să conțină urme de apă. Apa se poate elimina prin adăugarea unei site moleculare.

1.4.2.2. *Concentrațiile de expunere*

Printre criteriile ce trebuie să fie avute în vedere la determinarea dozei maxime sunt citotoxicitatea, solubilitatea în sistemul de testare și modificările de pH sau osmolalitate.

Citotoxicitatea ar trebui să se determine cu și fără activare metabolică în experimentul principal, utilizând un indicator corespunzător al integrității și dezvoltării celulare, ca eficacitatea clonării relative (supraviețuirea) sau creșterea totală relativă. Ar putea fi utilă determinarea citotoxicității și solubilității într-un experiment preliminar.

Ar trebui să se utilizeze cel puțin patru concentrații analizabile. Dacă o substanță este citotoxică, concentrațiile respective ar trebui să acopere un domeniu de toxicități de la maximă la mică sau lipsa toxicității; aceasta semnifică, de obicei, concentrații care ar trebui să fie separate printr-un factor cuprins între 2 și $\sqrt{10}$ maximum. Dacă, datorită citotoxicității, concentrația este maximă, ar trebui să determine un procent de supraviețuire relativă (eficacitatea relativă a clonării) sau o creștere totală relativă de aproximativ 10-20 % (dar nu mai puțin de 10 %). Pentru substanțele relativ necitotoxice, concentrația de testare maximă ar trebui să fie cea mai mică dintre următoarele trei concentrații: 5 mg/ml, 5μl/ml sau 1,01 M.

Substanțele relativ insolubile ar trebui să fie testate la concentrații egale sau superioare limitei de solubilitate în condițiile de cultură. Insolubilitatea ar trebui să fie pusă în evidență în mediul final de tratament în care se expun celulele. Ar putea fi utilă evaluarea solubilității la începutul și la sfârșitul tratamentului, deoarece solubilitatea poate să varieze în timpul expunerii în sistemul de testare datorită prezenței celulelor, S9, serului etc. Insolubilitatea se poate constata cu ochiul liber. Ar trebui ca precipitarea să nu interfereze cu determinarea rezultatelor.

1.4.2.3. *Martorii*

În fiecare experiment, ar trebui să se includă simultan martorii pozitivi și negativi (solvent și vehicul), atât cu, cât și fără activare metabolică. În prezența activării metabolice, substanța utilizată ca martor pozitiv ar trebui să fie aceea care necesită activare pentru a da un răspuns mutagen.

În tabelul următor sunt prezentate exemple de substanțe utilizate ca martori pozitivi:

Tipul activării	Poziția	Substanța	Nr. CAS	Nr. IESCE
Absența activării metabolice exogene	HPRT	Metansulfonat de etil	62-50-0	200-536-7
		Etil nitrozouree	759-73-9	212-072-2
	TK (colonii mici și mari)	Metansulfonat de metil	66-27-3	200-625-0
		XPRT	Metansulfonat de etil	62-50-0
	XPRT	Etil nitrozouree	759-73-9	212-072-2
		HPRT	3-metilcolantren	56-49-5
N-nitrozodimetilamină	62-75-9		200-549-8	
7,12-dimetilbenzantracen	57-97-6		200-359-5	
Prezența activării metabolice exogene	TK (colonii mici și mari)	Ciclofosfamidă	50-18-0	200-015-4
		Ciclofosfamidmonohidrat	6055-19-2	
		Benzo[a]piren	50-32-8	200-028-5
		3-metilcolantren	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-nitrozodimetilamină (pentru valori mari ale S9)	62-75-9	200-549-8
		Benzo[a]piren	50-32-8	200-028-5

Se pot utiliza și alte substanțe corespunzătoare ca martori pozitivi, de ex. se poate utiliza 5-bromo 2'-dezoxiuridina (nr. CAS 59-14-3, nr. IESCE 200-415-9), dacă laboratorul dispune de o bază de date anterioare privind această substanță. Ar trebui să se aibă în vedere utilizarea ca martori pozitivi a unor substanțe din aceeași clasă chimică, dacă sunt disponibile.

Ca martori negativi ar trebui să se utilizeze solvenți sau vehicule singure în mediul de tratare, care se tratează în aceleași condiții ca și culturile. În plus, ar trebui să se utilizeze și martori netratați, cu excepția cazului în care există date din testele anterioare care să ateste că solvențul selectat nu prezintă efecte vătămătoare sau mutagene.

1.4.3. **Modul de lucru**1.4.3.1. *Tratamentul cu substanța de testat*

Celulele în stadiu de proliferare se tratează cu substanța de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem de activare metabolică. Timpul de expunere ar trebui să fie corespunzător (de obicei, un timp de 3-6 ore este eficient). Timpul de expunere se poate prelungi cu unul sau mai multe cicluri celulare.

Fiecare concentrație se poate testa pe una sau pe două culturi tratate. Dacă se utilizează culturi unice, numărul concentrațiilor ar trebui să fie mai mare pentru a asigura un număr suficient de culturi pentru analiză (de ex. minimum opt concentrații analizabile). Se recomandă utilizarea culturilor duble pentru martorul negativ (solvent).

Testarea substanțelor în stare gazoasă și a celor volatile ar trebui să se realizeze prin metode specifice, de ex. în vase de cultură închise ermetic (21) (22).

1.4.3.2. *Determinări de supraviețuire, viabilitate și frecvența mutantului*

La sfârșitul perioadei de expunere, celulele se spală și se cultivă în mediul de cultură pentru determinarea supraviețuirii și pentru a permite manifestarea fenotipului mutant. Determinarea citotoxicității începe, de obicei, după perioada de tratament și constă în măsurarea eficacității de clonare relativă (supraviețuirii) sau a creșterii totale relative a culturilor.

Fiecărui locus îi corespunde un timp minim definit, necesar pentru a permite manifestarea aproape optimă a fenotipului mutațiilor nou induși (HPRT și XPRT necesită minimum 6-8 zile și TK minimum două zile). Pentru determinarea numărului de mutații și a eficacității clonării, celulele sunt crescute în mediu cu și, respectiv, fără agent sau agenți selectivi. Măsurarea viabilității (utilizată la calcularea frecvenței mutantului) începe la terminarea perioadei de manifestare prin depunerea celulelor într-un mediu neselectiv.

Dacă substanța de testat dă un rezultat pozitiv la testul pe TK^{+/-} L5178Y, dimensiunile coloniilor ar trebui să se determine pe minimum una dintre culturile experimentale (la concentrația pozitivă maximă) și pe martorii negativi și pozitivi. Dacă substanța de testat dă un rezultat negativ la testul pe TK^{+/-} L5178Y, dimensiunile coloniilor ar trebui să se determine pe martorii negativi și pozitivi. Dimensiunile coloniilor se pot determina și în studiile în care se utilizează TK6TK^{+/-}.

2. DATELE

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Datele ar trebui să conțină determinarea citotoxicității și viabilității, numărul de colonii și frecvențele mutațiilor pentru culturile tratate și cele martor. Dacă se obține un răspuns pozitiv în testul pe TK^{+/-} L5178Y, la numărătoarea coloniilor se face distincția între coloniile mici și mari pentru minimum o concentrație a substanței de testat (concentrația pozitivă maximă) și pentru martorul negativ și pozitiv. Ar trebui să se facă o examinare detaliată a naturii moleculare și citogenice a coloniilor mari și mici de mutații (23) (24). În testul pe TK^{+/-}, numărătoarea coloniilor se realizează conform criteriului de creștere normală (mare) și creștere lentă (mică) a coloniilor (25). Celulele mutante care au suferit cele mai însemnate alterări genetice au timp de duplicare prelungiți și formează, așadar, colonii mici. Această alterare variază, de obicei, de la pierderea întregii gene până la aberații cromozomiale care se manifestă în cariotip. Inducerea coloniilor mici de mutații este pusă pe seama substanțelor chimice care induc aberații cromozomiale însemnate (26). Celulele mutante mai puțin afectate se dezvoltă cu viteze similare cu cele ale celulelor originale și formează colonii mari.

Ar trebui să se prezinte datele privind supraviețuirea (eficacitatea clonării relative) sau creșterea totală relativă. Frecvența mutațiilor ar trebui să se exprime prin numărul de celule mutante împărțit la numărul de celule supraviețuitoare.

Ar trebui să se prezinte datele pentru fiecare cultură. În plus, toate datele ar trebui să se prezinte sub formă de tabel.

Nu este necesară verificarea unui răspuns pozitiv net. Rezultatele nesigure ar trebui să fie clarificate prin teste suplimentare, realizate de preferință prin modificarea condițiilor experimentale. Rezultatele negative necesită confirmare pentru fiecare caz. În cazurile în care se consideră că nu este necesară confirmarea rezultatelor negative, ar trebui să se ofere o justificare. Pentru testele de confirmare, atât a rezultatelor nesigure, cât și a celor negative, ar trebui să se aibă în vedere modificarea condițiilor experimentale pentru lărgirea gamei de condiții evaluate. Parametrii care ar putea fi modificați includ diferența dintre concentrații și condițiile de activare metabolică.

2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Există câteva criterii pentru determinarea unui rezultat pozitiv, ca o creștere în funcție de concentrație sau o creștere reproductibilă a frecvenței mutațiilor. În primul rând, ar trebui să se aibă în vedere relevanța biologică a rezultatelor. Pentru evaluarea rezultatelor testelor se poate recurge și la ajutorul unor metode statistice. Semnificația statistică nu ar trebui să fie singurul factor determinant pentru a decide cu privire la un răspuns pozitiv.

Dacă rezultatele obținute pentru o substanță de testat nu îndeplinesc criteriile menționate anterior, se consideră că substanța respectivă nu este mutagenă în prezentul sistem.

Deși majoritatea experimentelor vor da în mod clar rezultate pozitive sau negative, în unele cazuri rare, datele stabilite vor exclude posibilitatea unei concluzii definitive cu privire la activitatea substanței de testat. Rezultatele pot să rămână nesigure sau discutabile independent de numărul de repetări ale experimentului.

Rezultatele pozitive ale unui test *in vitro* de mutație genică pe celule de mamifere indică faptul că substanța de testat produce mutații genice în celulele de mamifere, în cultură. Un rezultat concentrație-răspuns pozitiv reproductibil este foarte semnificativ. Rezultatele negative indică faptul că, în condiții experimentale, substanța de testat nu produce mutații genice în celulele de mamifere utilizate, în cultură.

3. RAPORTAREA

RAPORTUL TESTULUI

Raportul testului trebuie să conțină următoarele informații:

Solventul/vehiculul:

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

Celulele:

- tipul și sursa celulelor;
- numărul de culturi celulare;
- numărul de reînsămânțări, dacă este cazul;
- metodele de întreținere a culturilor celulare, dacă este cazul;
- absența micoplasmei.

Condițiile de testare:

- justificarea alegerii concentrațiilor și numărului de culturi, inclusiv, de ex. datele de citotoxicitate și limitele de solubilitate, dacă sunt disponibile;
- compoziția mediului, concentrația CO₂;
- concentrația substanței de testat;
- volumul vehiculului și al substanței de testat adăugate;
- temperatura de incubare;
- timpul de incubare;
- durata tratamentului;
- densitatea celulară în timpul tratamentului;
- tipul și compoziția sistemului de activare metabolică, inclusiv criteriile de acceptabilitate;
- martorii pozitivi și negativi;
- timpul de manifestare (inclusiv numărul de celule însămânțate și reînsămânțate, programele de alimentare, dacă este cazul);
- agenții selectivi;
- criteriile utilizate la caracterizarea studiilor ca fiind pozitive, negative sau nesigure;

- metodele utilizate pentru numărătoarea celulelor viabile și mutante;
- definirea coloniilor pentru care se ține seama de dimensiuni și de tip (inclusiv criteriile pentru coloniile «mici» și «mari», dacă este cazul).

Rezultatele:

- semnele de toxicitate;
- semnele de precipitare;
- datele privind valoarea pH-ului și osmolalitatea în timpul expunerii la substanța de testat, dacă s-au determinat;
- dimensiunile coloniilor, dacă s-au determinat, cel puțin pentru martorii negativi și pozitivi;
- capacitatea laboratorului de a detecta mutații în colonii mici cu sistemul TK^{+/}-L5178Y, dacă este cazul;
- relația doză-răspuns, dacă este posibil;
- analizele statistice, dacă există;
- datele privind martorii negativi (solvent/vehicul) și pozitivi utilizați în paralel;
- datele anterioare privind martorii negativi (solvent/vehicul) și pozitivi, cu domeniile, valorile medii și deviațiile standard;
- frecvența mutațiilor.

Discutarea rezultatelor.

Concluziile.

4. BIBLIOGRAFIA

- (1) Moore, M. M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J. and Tindal, K. R. (eds.) (1987), *Banbury Report 28; Mammalian Cell Mutagenesis*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- (2) Chu, E. H. Y. and Malling H. V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 61, pp. 1306-1312.
- (3) Liber, H. L. and Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, *Mutation Res.* 94, pp. 467-485.
- (4) Moore, M. M., Harington-Brock, K., Doerr, C. L. and Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, *Mutagenesis*, 4, pp. 394-403.
- (5) Aaron, C. S., and Stankowski, Jr. L. F., (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, *Mutation Res.* 223, pp. 121-128.
- (6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L. F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.* 312, pp. 235-239.
- (7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.* 257, pp. 147-204.
- (8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavourmin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 115, pp. 225-251.
- (9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 196, pp. 17-36.

- (10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., ÓNeill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 135-141.
 - (11) Liber, H. L., Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res.*, 216, pp. 9-17.
 - (12) Stankowski, L. F. Jr., Tindal, K. R., and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate — and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate — and ICR 191 Induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.*, 160, pp. 133-147.
 - (13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedure for the L5178Y/TK^{+/-} — TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.
 - (14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith S. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.
 - (15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccolo, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res.* 46, pp. 365-373.
 - (16) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.* 31, pp. 347-364.
 - (17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/TK^{+/-} — Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat. Res.* 59, pp. 61-108.
 - (18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.* 113, pp. 173-215.
 - (19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in: *In Vitro Genotoxicity Assays*, *Mutagenesis* 7, pp. 175-177.
 - (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
 - (21) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Ticc, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91-103.
 - (22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.
 - (23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, pp. 51-55.
 - (24) Moore, M. M., Clive, D. Hozier, J. C., Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidine, Resistant (TFT⁺) Mutants of L5178Y/TK^{+/-} — Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.* 151, pp. 161-174.
 - (25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res.* 229, pp. 89-102.
 - (26) Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK^{+/-} — 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis*, 5, pp. 609-614.
-

ANEXA 4F

„B.23. TEST DE ABERAȚIE CROMOZOMIALĂ PE SPERMATOGONII DE MAMIFERE**1. METODA**

Prezenta metodă este reprodusă după orientarea OCDE TG 483, Testul de aberație cromozomială pe spermatozoană de mamifere (1997).

1.1. INTRODUCERE

Scopul testului *in vivo* de aberație cromozomială pe spermatozoană de mamifere constă în identificarea acelor substanțe care produc aberații cromozomiale ale structurii în celulele spermatogoniale ale mamiferelor (1) (2) (3) (4) (5). Aberațiile de structură pot fi de două tipuri, cromozomiale sau cromatidice. La majoritatea mutagenilor chimici, aberațiile induse sunt de tip cromatidic, dar se produc și aberații de tip cromozomial. Prezenta metodă nu este destinată determinării aberațiilor numerice și, în general, nu se utilizează în acest scop. Mutațiile cromozomiale și fenomenele conexe sunt cauza multor maladii genetice umane.

Prezentul test determină fenomenele cromozomiale din celulele germinale spermatogoniale și, prin urmare, ar trebui să permită estimarea mutațiilor transmisibile produse în celulele germinale.

Pentru test se utilizează, în general, rozătoare. Prezentul test citogenetic *in vivo* permite detectarea aberațiilor cromozomiale din mitozele spermatogoniale. Alte celule țintă nu fac obiectul prezentului test.

Pentru detectarea aberațiilor de tip cromatidic din celulele spermatogoniale, ar trebui să se examineze prima diviziune celulară mitotică după tratament, înainte ca leziunile respective să se piardă în diviziunile celulare ulterioare. Prin analiza cromozomilor meiotici pentru detectarea aberațiilor de tip cromozomial în diakineză-metafaza I când celulele tratate se transformă în spermatozoane, se pot obține informații suplimentare referitoare la celulele germinale spermatogoniale tratate.

Prezentul test *in vivo* este destinat să verifice dacă mutagenii sunt la fel de activi în celulele germinale ca și în celulele somatice. În plus, testul pe spermatozoană este relevant în evaluarea riscului de mutagenitate, deoarece permite să se țină seama de factorii de metabolism *in vivo*, de farmacocinetică și de procesele de regenerare a ADN.

Testiculele conțin un număr de generații de spermatozoane care prezintă sensibilități diferite la tratamentul chimic. Astfel, aberațiile detectate reprezintă un răspuns global al populațiilor de celule spermatogoniale tratate, în care predomină celulele spermatogoniale diferențiate, mai numeroase. În funcție de poziția în testicul, diferitele generații de spermatozoane pot să fie sau să nu fie expuse la substanțele prezente în circulația generală, datorită barierei fizice și fiziologice de celule Sertoli și barierei sânge-testicul.

Dacă există dovezi că substanța de testat sau un metabolit reactiv nu va ajunge la țesutul țintă, nu este indicată utilizarea prezentului test.

A se vedea și introducerea generală din partea B.

1.2. DEFINIȚII

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

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

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

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

Poliploidie: multiplicare a numărului (n) de cromozomi haploizi, alta decât diploidia (adică $3n$, $4n$ etc.).

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

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Animalele se expun la substanța de testat printr-o cale de expunere corespunzătoare și sunt sacrificate în momente corespunzătoare după tratament. Înainte de sacrificare, animalele se tratează cu o substanță de inhibare a metafazei (de ex. colchicină sau Colcemid[®]). Apoi, din celulele germinale, se realizează preparate cromozomiale care se colorează, iar celulele în metafază sunt analizate la microscop pentru detectarea aberațiilor cromozomiale.

1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.4.1. **Preparatele**

1.4.1.1. *Selectarea speciilor de animale*

Se utilizează, de obicei, hamsteri chinezești și șoareci de sex masculin. Cu toate acestea, se pot utiliza masculi din orice altă specie de mamifere adecvată. Se recomandă utilizarea unor animale adulte tinere sănătoase, din sușe utilizate în mod curent în laborator. La începutul studiului, greutatea animalelor ar trebui să prezinte o variație minimă, ce nu trebuie să depășească $\pm 20\%$ din greutatea medie.

1.4.1.2. *Condițiile de adăpost și hrană*

Se aplică condițiile generale menționate în introducerea generală din partea B, dar umiditatea atinsă ar trebui să fie de 50-60 %.

1.4.1.3. *Pregătirea animalelor*

Animalele de sex masculin, adulte, tinere, sănătoase se distribuie în mod aleatoriu în grupe martor și grupe de tratament. Cuștile ar trebui să se aranjeze astfel încât posibilele efecte datorate amplasării acestora să fie reduse la minimum. Animalele sunt identificate individual. Se procedează la aclimatizarea animalelor la condițiile de laborator timp de minimum cinci zile înainte de începerea studiului.

1.4.1.4. *Prepararea dozelor*

Substanțele de testat în stare solidă ar trebui să se prepare sub formă de soluții sau suspensii în solvenții sau vehiculele corespunzătoare și să se dilueze, dacă este cazul, înainte de a fi administrate animalelor. Substanțele de testat lichide se pot administra direct sau dilua înainte de administrare. Se recomandă utilizarea preparatelor proaspete de substanță de testat, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora în caz de păstrare.

1.4.2. **Condițiile de testare**

1.4.2.1. *Solventul/vehiculul*

Solventul/vehiculul nu ar trebui să producă efecte toxice la dozele utilizate și nu ar trebui să existe suspiciunea reacției chimice a acestuia cu substanța de testat. Utilizarea altor solvenți/vehiculi decât cei recunoscuți ar trebui să fie justificată cu date care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se prefere utilizarea unui solvent/vehicul apos.

1.4.2.2. *Martorii*

Pentru fiecare test ar trebui să se prevadă martori pozitivi și negativi (solvent/vehicul), utilizați în paralel. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, manipularea animalelor din grupele martor ar trebui să fie identică cu cea a animalelor din grupele tratate.

Martorii pozitivi ar trebui să producă aberații structurale ale cromozomului *in vivo* la celule spermatogoniale, la nivelurile de expunere preconizate a genera o creștere detectabilă în raport cu fondul.

Dozele de martor pozitiv ar trebui să fie alese astfel încât să se obțină efecte clare, dar fără să releve imediat examinătorului identitatea lamelelor codificate. Pentru martorul pozitiv, se poate accepta administrarea pe o cale diferită de cea prin care se administrează substanța de testat și doar o singură prelevare a probelor. În plus, se poate avea în vedere utilizarea unor martori pozitivi din aceeași clasă de produse chimice, dacă sunt disponibili. În tabelul următor se prezintă exemple de substanțe care se pot utiliza ca martori pozitivi:

Substanța	Nr. CAS	Nr. IESCE
ciclofosfamidă	50-18-0	200-015-4
ciclofosfamidă monohidrat	6055-19-2	
ciclohexilamină	108-91-8	203-629-0
mitomicină C	50-07-7	200-008-6
acrilamidă monomerică	79-06-1	201-173-7
trietilenmelamină	51-18-3	200-083-5

Martorii negativi, tratați doar cu solvent sau cu vehicule și manipulați în același fel ca și grupele tratate, ar trebui să fie incluși la fiecare prelevare de probe, cu excepția cazului în care se dispune de date acceptabile privind variabilitatea interanimale și frecvența celulelor cu aberații cromozomiale, provenite de la martori anteriori. În plus, ar trebui să se utilizeze și martori netratați, cu excepția cazului în care există date de la martori anteriori sau publicate care să ateste că solventul/vehiculul selectat nu prezintă efecte vătămătoare sau mutagene.

1.5. MODUL DE LUCRU

1.5.1. Numărul de animale

Fiecare grupă tratată și martor trebuie să includă minimum cinci animale de sex masculin, analizabile.

1.5.2. Modalitatea de tratare

Substanțele de testat se administrează de preferință o dată sau de două ori (adică un singur tratament sau două tratamente). Substanțele de testat se mai pot administra în doze fracționate, adică două tratamente în aceeași zi la distanță de doar câteva ore, pentru a facilita administrarea unui volum mare de material. Alte modalități de administrare ar trebui să fie justificate în mod științific.

La grupa cu doza maximă prelevarea probelor după tratament se realizează în două momente. Deoarece substanța de testat poate să influențeze cinetica ciclului celular, prima și ultima prelevare de probe se realizează la intervale de 24 de ore și respectiv de 48 de ore după tratament. Pentru alte doze decât doza maximă, prelevarea probelor ar trebui să se realizeze la un interval de 24 de ore sau la un interval de timp egal cu de 1,5 ori durata ciclului celular după tratament, cu excepția cazului în care se cunoaște un alt moment corespunzător de prelevare pentru detectarea efectelor (6).

În plus, se pot utiliza și alte momente de prelevare. De exemplu, pentru produsele chimice care pot produce cromozomi întârziați sau pot să aibă efecte independente de faza S, o prelevare timpurie a probelor ar putea fi adecvată (1).

Adecvarea unui tratament repetat ar trebui să se determine de la caz la caz. După un program de tratamente repetate, animalele ar trebui să fie sacrificate după 24 de ore (1,5 ori durata ciclului celular) de la ultimul tratament. Se pot utiliza momente suplimentare de prelevare a probelor, dacă este necesar.

Înainte de sacrificare, se procedează la injectarea intraperitoneală a animalelor cu o doză corespunzătoare de substanță de inhibare a metafazei (de ex. Colcemid[®] sau colchicină). Probele de la animale se prelevează apoi la un interval corespunzător. Pentru șoareci intervalul respectiv este de aproximativ 3-5 ore; pentru hamsterii chinezești intervalul este de 4-5 ore.

1.5.3. Dozele

Dacă, în lipsa datelor corespunzătoare, se realizează un studiu pentru stabilirea dozelor, acesta ar trebui să se realizeze în același laborator și să utilizeze aceeași specie, aceeași sușă de animale și același regim de tratare ca în studiul principal ce urmează (7). În caz de toxicitate, se utilizează trei doze diferite pentru prima prelevare. Aceste trei doze ar trebui să acopere un domeniu de toxicități de la toxicitatea maximă până la toxicitatea minimă sau lipsă. Pentru prelevările ulterioare se utilizează doar doza maximă. Doza maximă se definește ca doza ce produce astfel de semne de toxicitate încât dozele mai mari, administrate în același mod, se estimează că sunt letale.

Substanțele cu activitate biologică specifică la doze mici netoxice (ca hormonii și mitogenii) pot face excepție de la criteriile de stabilire a dozelor și să fie stabilite pentru fiecare caz în parte. Doza maximă se mai poate defini ca doza care produce anumite semne de toxicitate în celulele spermatogoniale (de ex. o diminuare a proporției de mitoze spermatogoniale în raport cu prima și a doua metafază meiotică; reducerea respectivă nu ar trebui să fie mai mare de 50 %).

1.5.4. Test limită

Dacă un test realizat cu o doză de minimum 2 000 mg/kg greutate corp, administrată într-o singură repriză sau în două reprize în aceeași zi, nu produce efecte toxice detectabile și dacă o genotoxicitate este improbabilă pe baza datelor referitoare la substanțe cu o structură apropiată, se poate considera că un studiu complet cu utilizarea a trei doze de mărimi diferite nu este necesar. În funcție de expunerea umană preconizată, ar putea fi necesară o doză mai mare în testul limită.

1.5.5. Administrarea dozelor

Substanța de testat se administrează, de obicei, prin cavitatea nazală cu ajutorul unui tub stomacal sau al unei canule de intubație adaptate sau printr-o injecție intraperitoneală. Se pot accepta și alte căi de administrare, dacă se pot justifica. Volumul maxim de lichid care se poate administra prin sondă gastrică introdusă prin cavitatea nazală sau prin injecție într-o singură repriză depinde de dimensiunea animalului de laborator. Volumul ar trebui să fie mai mic sau egal cu 2 ml/100 g greutate corp. Utilizarea unor volume mai mari decât cel menționat ar trebui să se justifice. Cu excepția substanțelor iritante și corozive care vor prezenta în mod normal efecte exacerbate la concentrații mai mari, variația volumului testat ar trebui să fie redusă la minimum prin ajustarea concentrației, astfel încât să se asigure un volum constant pentru toate dozele.

1.5.6. Prepararea cromozomilor

Imediat după sacrificare, suspensiile celulare obținute de la unul sau două testicule se expun la o soluție hipotonică și se fixează. Celulele se întind apoi pe lamele și se colorează.

1.5.7. Analiza

Pentru fiecare animal ar trebui să se analizeze minimum 100 de celule în metafază, bine etalate (de ex. minimum 500 de celule în metafază pentru fiecare grupă). Dacă se observă un număr mai mare de aberații, numărul specificat se poate reduce. Toate lamelele, inclusiv cele cu celule de la martorii pozitivi și negativi, ar trebui să fie codificate independent înainte de examinarea la microscop. Deoarece metodele de preparare a lamelelor conduc adesea la scindarea unei fracții de celule în metafază cu pierdere de cromozomi, toate celulele examinate ar trebui, prin urmare, să conțină un număr de centromeri egal cu $2n \pm 2$.

2. DATELE

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Se recomandă prezentarea sub formă de tabel a datelor pentru fiecare animal. Unitatea experimentală este animalul. Pentru fiecare animal, ar trebui să se evalueze numărul de celule cu aberații cromozomiale de structură și numărul de aberații cromozomiale per celulă. Diferitele tipuri de aberații cromozomiale de structură ar trebui să fie consemnate împreună cu numărul și frecvența acestora pentru grupele tratate și pentru grupele martor. Lacunele se consemnează și se raportează separat, dar în general acestea nu se includ în frecvența totală a aberațiilor.

Dacă se observă concomitent mitoză și meioză, ar trebui să se determine raportul dintre mitozele spermatogoniale în prima, respectiv în a doua metafază meiotică; această determinare ar trebui să se realizeze pentru toate animalele tratate și cele martori negativi, pe un eșantion total de 100 de celule în diviziune pentru fiecare animal pentru a stabili un posibil efect citotoxic. Dacă se constată doar mitoză, ar trebui să se determine indexul mitotic în minimum 1 000 de celule pentru fiecare animal.

2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Există câteva criterii pentru determinarea unui rezultat pozitiv, ca o creștere în funcție de doză a numărului relativ de celule cu aberații cromozomiale sau o creștere netă a numărului de celule cu aberații la o singură doză și la o singură prelevare a probelor. În primul rând ar trebui să se aibă în vedere relevanța biologică a rezultatelor. Pentru evaluarea rezultatelor testelor se poate recurge și la ajutorul unor metode statistice (8). Semnificația statistică nu ar trebui să fie singurul factor determinant pentru a decide cu privire la un răspuns pozitiv. Rezultatele nesigure ar trebui să fie clarificate prin teste suplimentare, realizate de preferință printr-o modificare a condițiilor experimentale.

Dacă rezultatele obținute pentru o substanță de testat nu îndeplinesc criteriile menționate anterior, se consideră că substanța respectivă nu este mutagenă în prezentul test.

Deși majoritatea experimentelor vor da în mod clar rezultate pozitive sau negative, în unele cazuri rare, datele stabilite vor exclude posibilitatea unei concluzii definitive cu privire la activitatea substanței de testat. Rezultatele pot să rămână nesigure sau discutabile independent de numărul de repetări ale experimentului.

Rezultatele pozitive ale unui test *in vivo* de aberație cromozomială pe celulele spermatogoniale indică faptul că substanța de testat produce aberații cromozomiale de structură în celulele sexuale ale speciei testate. Rezultatele negative indică faptul că, în condițiile de testare, substanța de testat nu produce aberații cromozomiale în celulele germinale ale speciei testate.

Ar trebui să se discute probabilitatea ca substanța de testat sau metaboliții acesteia să ajungă la țesutul țintă.

3. RAPORTAREA

RAPORTUL TESTULUI

Raportul testului trebuie să conțină următoarele informații:

Solventul/vehiculul:

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

Animalele de laborator:

- specia/sușa utilizată;
- numărul și vârsta animalelor;
- sursa, condițiile de adăpost și hrană etc.;
- greutatea fiecărui animal la începutul testului, inclusiv intervalul de greutate, greutatea medie și deviația standard pentru fiecare grupă.

Condițiile de testare:

- datele din studiul pentru stabilirea dozelor, dacă s-a realizat;
- justificarea alegerii dozelor utilizate;
- justificarea căii de administrare selectate;
- detalii privind prepararea substanței de testat;
- detalii privind administrarea substanței de testat;
- justificarea momentelor de sacrificare;

- conversia concentrației substanței de testat (ppm) în hrană/apa de băut în doza reală (mg/kg greutate corp/zi), dacă este cazul;
- detalii privind calitatea hranei și a apei;
- descrierea amănunțită a modalităților de tratare și de prelevare a probelor;
- metodele de măsurare a toxicității;
- identitatea substanței de inhibare a metafazei, concentrația acesteia și durata tratamentului;
- metodele de preparare a lamelelor;
- criteriile pentru numărătoarea aberațiilor;
- numărul de celule analizate per animal;
- criteriile utilizate la caracterizarea studiilor ca fiind pozitive, negative sau nesigure.

Rezultatele:

- semnele de toxicitate;
- indexul mitotic;
- procentul de celule spermatogoniale în mitoză în raport cu cele din prima și a doua metafază meiotică;
- tipul și numărul aberațiilor, consemnate separat pentru fiecare animal;
- numărul total de aberații pentru fiecare grupă;
- numărul de celule cu aberații pentru fiecare grupă;
- relația doză-răspuns, dacă este posibil;
- analizele statistice, dacă există;
- datele privind martorii negativi studiați în paralel;
- datele anterioare privind martorii negativi, cu domeniile, valorile medii și deviațiile standard;
- datele privind martorii pozitivi studiați în paralel;
- modificările ploidiei, dacă există.

Discutarea rezultatelor.

Concluziile.

4. BIBLIOGRAFIA

- (1) Adler, I. D., (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis*, Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (eds) Liss, New York, pp. 477-484.
- (2) Adler, I. D., (1984), Cytogenetic tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, (ed.) S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
- (3) Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E. (1964), An Air-drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, pp. 289-294.

- (4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
 - (5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, *Mutation Res.*, 52, pp. 207-209.
 - (6) Adler, I. D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, *Mutation Res.*, 312, pp. 313-318.
 - (7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
 - (8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clarc, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.
-

ANEXA 4G

„B.39. TEST IN VIVO DE SINTEZĂ NEPROGRAMATĂ A ADN (UDS) PE CELULE HEPATICE DE MAMIFERE**1. METODA**

Prezenta metodă este reprodusă după orientarea OCDE TG 486, Testul *in vivo* de sinteză neprogramată a ADN (UDS) pe celule hepatice de mamifere (1997).

1.1. INTRODUCERE

Scopul testului *in vivo* de sinteză neprogramată a ADN (UDS) pe celule hepatice de mamifere este identificarea substanțelor de testat care induc regenerarea ADN în celulele hepatice ale animalelor (1) (2) (3) (4).

Prezentul test *in vivo* oferă o metodă pentru studiul efectelor genotoxice ale produselor chimice în ficat. Efectul măsurat este o indicație a deteriorării ADN și a regenerării ulterioare a acestuia în celulele hepatice. Ficatul este, de obicei, principalul loc de metabolism al compușilor absorbiți. De aceea, este un loc corespunzător pentru determinarea *in vivo* a degradării ADN.

Dacă există dovezi că substanța de testat nu ajunge la țesutul țintă, nu este indicată utilizarea prezentului test.

Sinteza neprogramată a ADN (UDS) se determină prin încorporarea nucleozidelor marcate în celulele care nu suferă o sinteză programată (faza S) a ADN. Metoda utilizată cel mai frecvent constă în determinarea prin autoradiografie a timidinei marcate cu tritiu (³H-TdR) care a fost încorporată. Pentru testele *in vivo*, UDS se preferă utilizarea ficatului de șobolan. Se pot utiliza și alte țesuturi, dar acestea nu constituie obiectul prezentei metode.

Detectarea unui răspuns UDS depinde de numărul de baze din ADN excizate și înlocuite la locul modificării. Prin urmare testul UDS este valoros în special pentru detectarea regenerării secvențelor lungi (20-30 de baze) induse de substanță. Spre deosebire de acestea, pentru detectarea regenerării secvențelor scurte (1-3 baze) este necesară o sensibilitate mult mai mică. În plus, datorită nereparării, unei reparări eronate sau a unei replicări eronate a leziunilor din ADN, pot apărea fenomene mutagene. Amploarea răspunsului UDS nu oferă nici o indicație despre fidelitatea procesului de regenerare. În plus, este posibilă reacția unui mutagen cu ADN, fără ca modificarea ADN rezultată să poată fi remediată printr-un proces de reparare prin excizie. În testul UDS, lipsa informațiilor specifice privind activitatea mutagenă este compensată de sensibilitatea potențială a acestui efect, care se poate măsura în totalitatea genomului.

A se vedea și introducerea generală din partea B.

1.2. DEFINIȚII

Celule în curs de reparare: număr net de grăunți nucleari (NNG) mai mare decât o valoare prestabilită, ce trebuie justificată de laboratorul care realizează testul.

Număr net de grăunți nucleari (NNG): măsură cantitativă a activității UDS a celulelor în testele autoradiografice UDS, calculată prin scăderea numărului mediu de grăunți citoplasmici din zonele citoplasmice echivalente nucleului (CG) din numărul de grăunți nucleari (NG): $NNG = NG - CG$. NNG se calculează pentru celulele individuale, iar apoi se extrapolează pentru celulele dintr-o cultură, din culturi paralele etc.

Sinteza neprogramată a ADN (UDS): sinteza reparării ADN după excizia și eliminarea unui fragment din ADN, ce conține o regiune deteriorată indusă de acțiunea unor substanțe chimice sau a unor agenți fizici.

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Testul *in vivo* UDS pe celule hepatice de mamifere indică o sinteză de reparare a ADN după excizia și eliminarea unui fragment din ADN, ce conține o regiune deteriorată indusă de acțiunea unor substanțe chimice sau a unor agenți fizici. Testul se întemeiază, de obicei, pe încorporarea ³H-TdR în ADN-ul celulelor hepatice care prezintă o frecvență redusă de celule în faza S a ciclului celular. Încorporarea ³H-TdR se determină, de obicei, prin autoradiografie, deoarece această tehnică nu este sensibilă la interferența cu celulele în fază S, așa cum este, de exemplu, numărătoarea în scintilație lichidă.

1.4. DESCRIEREA METODEI

1.4.1. **Preparatele**1.4.1.1. *Selectarea speciei de animale*

Se utilizează, de obicei, șobolani, deși se poate utiliza orice specie de mamifere. Se recomandă utilizarea unor animale adulte tinere sănătoase din sușe folosite în mod curent în laborator. La începutul studiului, greutatea animalelor ar trebui să prezinte variații minime, ce nu trebuie să depășească $\pm 20\%$ din greutatea medie a fiecărui sex.

1.4.1.2. *Condițiile de adăpost și hrană*

Se aplică condițiile generale menționate în introducerea generală din partea B, dar umiditatea atinsă ar trebui să fie de 50-60 %.

1.4.1.3. *Pregătirea animalelor*

Animalele adulte tinere sănătoase se distribuie în mod aleatoriu în grupe martor și grupe de tratament. Cuștile ar trebui să se aranjeze astfel încât posibilele efecte datorate amplasării acestora să fie reduse la minimum. Animalele sunt identificate individual și se țin în cuștile lor timp de minimum cinci zile înainte de începerea studiului, pentru a permite aclimatizarea acestora la condițiile de laborator.

1.4.1.4. *Substanța de testat/prepararea*

Substanțele de testat în stare solidă ar trebui să se prepare sub formă de soluții sau suspensii în solvenții sau vehiculele corespunzătoare și să se dilueze, dacă este cazul, înainte de a fi administrate animalelor. Substanțele de testat lichide se pot administra direct sau dilua înainte de administrare. Se recomandă utilizarea preparatelor proaspete de substanță de testat, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora în caz de păstrare.

1.4.2. **Condițiile de testare**1.4.2.1. *Solventul/vehiculul*

Solventul/vehiculul nu ar trebui să producă efecte toxice la dozele utilizate și nu ar trebui să existe suspiciunea reacției chimice a acestuia cu substanța de testat. Utilizarea altor solvenți/vehicule decât cele recunoscute ar trebui să fie justificată cu date care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se prefere utilizarea unui solvent/vehicul apos.

1.4.2.2. *Martorii*

Martorii pozitivi și negativi (solvent/vehicul) utilizați în paralel ar trebui să se includă în fiecare parte a experimentului, realizată independent. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, manipularea animalelor din grupele martor ar trebui să fie identică cu cea a animalelor din grupele tratate.

Martorii pozitivi ar trebui să fie substanțe despre care se știe că produc UDS atunci când se administrează în doze de expunere estimate a genera o creștere detectabilă în raport cu fondul. Martorii pozitivi care necesită o activare metabolică ar trebui să se utilizeze în doze care provoacă un răspuns moderat (4). Dozele se pot alege astfel încât să se obțină efecte clare, dar fără să releve imediat examinătorului identitatea lamelelor codificate. În tabelul următor se prezintă exemple de substanțe care se pot utiliza ca martori pozitivi:

Momentele de prelevare a probelor	Substanța	Nr. CAS	Nr. IESCE
Primele prelevări (2-4 ore)	N-nitrozodimetilamină	62-75-9	200-249-8
Ultimele prelevări (12-16 ore)	N-2-fluorenilacetamidă (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Se pot utiliza și alte substanțe corespunzătoare ca martori pozitivi. Martorul pozitiv ar trebui să se administreze pe o cale diferită de cea pentru substanța de testat.

1.5. MODUL DE LUCRU**1.5.1. Numărul și sexul animalelor**

Ar trebui să se utilizeze un număr suficient de animale pentru a ține seama de variația răspunsului testului în funcție de natura biologică. Ar trebui să se utilizeze un număr de minimum trei animale analizabile din fiecare grupă. Dacă în momentul studiului există date acumulate din experimentele anterioare, sunt necesare doar unul sau două animale pentru grupele de martorii pozitivi și negativi analizate în paralel.

Dacă în momentul studiului există date disponibile din studii pe aceeași specie, în care s-a folosit aceeași cale de expunere, care să demonstreze lipsa unor diferențe substanțiale de toxicitate între sexe, atunci va fi suficientă testarea pe animale de un singur sex, de preferință de sex masculin. Dacă expunerea umană la produse chimice este specifică sexului, ca în cazul unor produse farmaceutice, testul ar trebui să se realizeze pe animale de sex corespunzător.

1.5.2. Modalitatea de tratare

Substanțele se administrează în general într-o singură repriză.

1.5.3. Dozele

În mod normal, se utilizează minimum două doze diferite. Doza maximă se definește ca doza ce produce astfel de semne de toxicitate, încât dozele mai mari, administrate în același mod, se estimează că sunt letale. În general, doza mai mică trebuie să fie egală cu 50 % până la 25 % din doza mare.

Substanțele cu activitate biologică specifică la doze mici netoxice (ca hormonii și mitogenii) pot să facă excepție de la criteriile de stabilire a dozelor și ar trebui evaluate pentru fiecare caz în parte. Dacă, în lipsa datelor corespunzătoare, se realizează un studiu pentru stabilirea dozelor, acesta ar trebui să se realizeze în același laborator și să utilizeze aceeași specie, aceeași sușă de animale de același sex și regimul de tratare să fie același ca cel ce urmează să fie utilizat în studiul principal.

Doza maximă se mai poate defini ca doza care produce anumite semne de toxicitate în ficat (de ex. nucleu picnotice).

1.5.4. Test limită

Dacă un test realizat cu o doză de minimum 2 000 mg/kg greutate corp, administrată într-o singură repriză sau în două reprize în aceeași zi, nu produce efecte toxice detectabile și dacă o genotoxicitate este improbabilă pe baza datelor referitoare la substanțe cu o structură apropiată, se poate considera că un studiu complet nu este necesar. În funcție de expunerea umană preconizată, ar putea fi necesară o doză mai mare în testul limită.

1.5.5. Administrarea dozelor

Substanța de testat se administrează, de obicei, prin cavitatea nazală cu ajutorul unui tub stomacal sau al unei canule de intubație adaptate. Se pot accepta și alte căi de administrare, dacă se pot justifica. Cu toate acestea, calea intraperitoneală nu se recomandă, deoarece probabilitatea de expunere a ficatului este mai mare decât la administrarea prin intermediul sistemului circulator. Volumul maxim de lichid care se poate administra prin sondă gastrică introdusă prin cavitatea nazală sau prin injecție într-o singură repriză depinde de dimensiunea animalului de laborator. Volumul ar trebui să fie mai mic sau egal cu 2 ml/100 g greutate corp. Utilizarea unor volume mai mari decât cel menționat ar trebui să se justifice. Cu excepția substanțelor iritante și corozive, care vor prezenta în mod normal efecte exacerbate la concentrații mai mari, variația volumului testat ar trebui să fie redusă la minimum prin ajustarea concentrației, astfel încât să se asigure un volum constant pentru toate dozele.

1.5.6. Prepararea celulelor hepatice

Prelevarea celulelor hepatice de la animalele tratate se realizează, de obicei, după 12-16 ore de la administrarea dozei. În general, mai este necesară o prelevare (de obicei, după două până la patru ore de la tratament), cu excepția cazului în care există un răspuns pozitiv net după 12-16 ore. Cu toate acestea, se pot utiliza și alte momente de prelevare, dacă datele toxicocinetice justifică acest lucru.

Culturile pe termen scurt de celule hepatice de mamifere se realizează, de obicei, perfuzând ficatul *in situ* cu colagenază și lăsând celulele hepatice proaspăt disociate să se fixeze pe o suprafață corespunzătoare. Celulele hepatice de la animale martori negativi ar trebui să aibă o viabilitate (5) de minimum 50 %.

1.5.7. Determinarea UDS

Celulele hepatice proaspăt izolate se supun în general incubării într-un mediu, ce conține $^3\text{H-TdR}$, pentru o perioadă de timp corespunzătoare, de ex. trei până la opt ore. La încheierea perioadei de incubare, ar trebui ca mediul să fie îndepărtat de pe celule, care pot să fie incubate apoi într-un mediu, ce conține timidină nemarcată în exces, pentru diminuarea radioactivității neîncorporate («cold chase»). Celulele sunt apoi spălate, fixate și uscate. Pentru perioade de incubare mai lungi, s-ar putea ca procedeul «cold chase» să nu fie necesar. Lamelele sunt imersate în soluție autoradiografică, păstrate la întuneric (de ex. refrigerate timp de 7-14 zile), dezvoltate, colorate și apoi se procedează la numărarea grăunților de argint expuși. Pentru fiecare animal se pregătesc două până la trei lamele.

1.5.8. Analiza

Preparatele depuse pe lamele ar trebui să conțină un număr suficient de celule cu o morfologie normală, pentru a permite o evaluare semnificativă a UDS. Preparatele se examinează la microscop pentru identificarea semnelor de citotoxicitate evidentă (de ex. picnoză, diminuarea nivelului de marcaj radioactiv).

Se recomandă codificarea lamelelor înainte de numărătoarea grăunților. În general, pentru fiecare animal se identifică 100 de celule pe minimum două lamele; numărătoarea unui număr de celule mai mic de 100 pentru fiecare animal ar trebui justificată. Numărul de grăunți nu se determină pentru nucleeele în fază S, dar se poate înregistra proporția de celule în faza S.

Cantitatea de $^3\text{H-TdR}$ încorporată în nucleeele și citoplasma celulelor normale din punct de vedere morfologic, puse în evidență prin depunerea de grăunți de argint, ar trebui să se determine prin metode corespunzătoare.

2. DATELE

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Ar trebui să se prezinte date pentru fiecare lamelă și pentru fiecare animal. În plus, toate datele ar trebui să se prezinte sub formă de tabel. Numărul net de grăunți nucleari (NNG) ar trebui să se calculeze pentru fiecare celulă, pentru fiecare animal și pentru fiecare doză și moment de prelevare prin scăderea numărului CG din numărul NG. Dacă se face numărătoarea «celulelor în curs de reparare», ar trebui să se justifice criteriile folosite la definirea «celulelor în curs de reparare», care ar trebui să se întemeieze pe datele obținute din experimentele anterioare sau pe datele obținute pe martori negativi testați în paralel. Pentru evaluarea rezultatelor numerice se pot utiliza metode statistice. În acest caz, ar trebui, înaintea realizării studiului, să se selecteze și să se justifice testele statistice.

2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Exemplele de criterii de răspunsuri pozitive/negative includ:

- | | | |
|---------|------|---|
| pozitiv | (i) | valori ale NNG mai mari de o valoare-prag stabilită, care se justifică prin datele obținute în laborator în experimente anterioare; |
| sau | (ii) | valori ale NNG cu mult mai mari decât cele pentru martorul analizat în paralel; |
| negativ | (i) | valori ale NNG egale cu/mai mici decât valoarea-prag pentru martor, rezultată din experimente anterioare |
| sau | (ii) | valori ale NNG care nu sunt cu mult mai mari decât cele pentru martorul analizat în paralel. |

Ar trebui să se aibă în vedere relevanța biologică a rezultatelor: adică ar trebui să se țină seama de parametri ca variația între animale, relația doză-răspuns și citotoxicitatea. Pentru evaluarea rezultatelor testelor se poate recurge și la ajutorul unor metode statistice. Semnificația statistică nu ar trebui să fie totuși singurul factor determinant pentru a decide cu privire la un răspuns pozitiv.

Deși majoritatea experimentelor vor da în mod clar rezultate pozitive sau negative, în anumite cazuri rare, datele stabilite vor exclude posibilitatea unei concluzii definitive cu privire la activitatea substanței de testat. Rezultatele pot să rămână nesigure sau discutabile independent de numărul de repetări ale experimentului.

Un rezultat pozitiv al unui test UDS *in vivo* pe celule hepatice de mamifere indică faptul că substanța de testat produce leziuni *in vivo* ale ADN din celulele hepatice ale mamiferelor, care se pot remedia prin sinteza neprogramată a ADN *in vitro*. Un rezultat negativ indică faptul că, în condițiile experimentale, substanța de testat nu produce o deteriorare a ADN care să se poată detecta prin prezentul test.

Ar trebui să se discute probabilitatea ca substanța de testat să ajungă în circulația generală sau la țesutul țintă (de ex. toxicitatea sistemică).

3. **RAPORTAREA**

RAPORTUL TESTULUI

Raportul testului trebuie să conțină următoarele informații:

Solventul/vehiculul:

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

Animalele de laborator:

- specia/sușa utilizată;
- numărul, vârsta și sexul animalelor;
- sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;
- greutatea fiecărui animal la începutul testului, inclusiv intervalul de greutate, greutatea medie și deviația standard pentru fiecare grupă.

Condițiile de testare:

- martorii pozitivi și negativi vehicul/solvent;
- datele din studiul pentru stabilirea dozelor, dacă s-a realizat;
- justificarea alegerii dozelor utilizate;
- detalii privind prepararea substanței de testat;
- detalii privind modalitatea de administrare selectată;
- justificarea căii de administrare alese;
- metode de verificare pentru a constata dacă substanța de testat a ajuns în circulația generală sau în țesutul țintă, dacă este cazul;
- conversia concentrației substanței de testat (ppm) în hrană/apa de băut în doza reală (mg/kg greutate corp/zi), dacă este cazul;
- detalii privind calitatea hranei și a apei;
- descrierea amănunțită a modalităților de tratare și de prelevare a probelor;
- metodele de măsurare a toxicității;
- metoda de preparare și de cultură a celulelor hepatice;
- metoda autoradiografică utilizată;

- numărul de lamele preparate și numărul de celule numărate;
- criteriile de evaluare;
- criteriile utilizate la caracterizarea studiilor ca fiind pozitive, negative sau nesigure.

Rezultatele:

- valorile medii ale numărului de grăunți nucleari, grăunți citoplasmatici și numărului net de grăunți nucleari pentru fiecare lamelă, fiecare animal și fiecare grupă;
- relația doză-răspuns, dacă este posibil;
- evaluarea statistică, dacă există;
- semnele de toxicitate;
- datele privind martorii negativi (solvent/vehicul) și pozitivi studiați în paralel;
- datele anterioare privind martorii negativi (solvent/vehicul) și pozitivi, cu domeniile, valorile medii și deviațiile standard;
- numărul de celule «în curs de reparare», dacă s-a determinat;
- numărul de celule în faza S, dacă s-a determinat;
- viabilitatea celulelor.

Discutarea rezultatelor.

Concluziile.

4. **BIBLIOGRAFIA**

- (1) Ashby, J. Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the In Vivo Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.*, 156, pp. 1-18.
- (2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the In Vivo Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 123-133.
- (3) Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell, I. de G. (1993), In Vivo Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.
- (4) Madle, S., Dean, S. W., Andrac, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests In Vitro and In Vivo, *Mutation Res.*, 312, pp. 263-285.
- (5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl. C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the In Vivo/In Vitro DNA Repair Assay (UDS), *Mutation Res.*, 291, pp. 21-27.
- (6) Mirsalis, J. C., Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the In Vivo/In Vitro Hepatocyte DNA Repair Assay, *Environ. Mutagen*, 4, pp. 553-562.

ANEXA 5

A se vedea Directiva 2001/59/CE a Comisiei (JO L 225, 21.8.2001, p. 1).

ANEXA 6

„ANEXA IX

PARTEA A

Dispoziții privind sistemele de închidere de siguranță pentru copii

În afară de dispozițiile prevăzute la articolul 22 alineatul (1) litera (e) din prezenta directivă, recipientele de orice capacitate, ce conțin substanțe periculoase în caz de aspirare (Xn; R65), și care sunt clasificate și etichetate în conformitate cu punctul 3.2.3 din anexa VI la prezenta directivă, cu excepția substanțelor introduse pe piață sub formă de aerosoli sau în recipiente prevăzute cu dispozitive de pulverizare fixate ermetic, sunt prevăzute cu sisteme de închidere de siguranță pentru copii.

1. *Ambalaje care se reînchid*

Sistemele de închidere de siguranță pentru copii, cu care sunt prevăzute ambalajele care se reînchid, respectă standardul ISO 8317 (ediția din 1 iulie 1989) intitulat «Ambalaje de siguranță pentru copii - Cerințe și metode de încercare pentru ambalajele care se reînchid» adoptat de Organizația Internațională de Standardizare (ISO).

2. *Ambalaje care nu se reînchid*

Sistemele de închidere de siguranță pentru copii, cu care sunt prevăzute ambalajele care nu se reînchid, respectă standardul CEN EN 862 (ediția din martie 1997) intitulat «Ambalarea – Ambalare de siguranță pentru copii – Cerințe și metode de încercare pentru ambalajele care nu se reînchid, destinate produselor farmaceutice» adoptat de Comitetul European pentru Standardizare (CEN).

3. *Note*

1. Doar laboratoarele care îndeplinesc seria de standarde europene EN 45 000 sunt autorizate să certifice conformitatea cu standardele menționate anterior.

2. *Cazuri particulare*

Dacă pare evident că ambalarea prezintă siguranță suficientă pentru copii, deoarece aceștia din urmă nu pot accede la conținut fără ajutorul unui instrument, nu mai este necesară realizarea testului.

Pentru toate celelalte cazuri, în care există motive suficiente de îndoială cu privire la eficiența sistemului de închidere de siguranță pentru copii, autoritatea națională poate solicita persoanei responsabile cu introducerea pe piață a produsului să-i prezinte un certificat de la un laborator, definit la punctul 3.1, care să precizeze următoarele:

— că tipul sistemului de închidere utilizat este de așa natură încât nu necesită teste conform standardelor ISO și CEN menționate anterior

sau

— că sistemul de închidere a fost supus la teste și s-a constatat că se conformează standardelor menționate anterior.

PARTEA B

Dispoziții referitoare la dispozitivele de avertizare tactilă

Specificațiile tehnice pentru dispozitivele de avertizare tactilă se conformează standardului EN ISO 11 683 (ediția din 1997) intitulat «Ambalarea - Avertizarea tactilă privind pericolul - Cerințe».
