

TESTAREA TOXICITĂȚII MEDICAMENTELOR DE UZ VETERINAR

TOXICITY TESTING OF THE VETERINARY USE DRUGS

Gh Solcan, I. S. Beșchea Chiriac

Facultatea de Medicină Veterinară Iași

Rezumat

Medicamentele și produsele fitosanitare, înainte de a fi lansate pe piață, trebuie testate din punct de vedere al inocuității și toxicității, evaluându-se riscul de îmbolnăvire pentru persoanele care fabrică, manipulează, comercializează produsul, pentru animalele sau persoanele tratate și pentru consumatorii în hrana cărora ajung reziduurile din produs.

Studiile de toxicitate experimentală, după Milhaud și col., (1994), se clasifică în 7 grupe:

- studiul experimental al toxicității acute;
- studiul efectului iritant local și al sensibilizării alergice;
- studiul efectelor mutagene;
- studiul toxicității subacute;
- studiul toxicității pe termen lung și a efectului carcinogen;
- studiul embriotoxicității și a efectelor asupra reproducției;
- studii de ecotoxicitate.

Abstract

Before the authorization for comercialization both medical and phyto-sanitary products must be tested for innocuity and toxicity, the risk assesment for persons working in drug industry, pharmacy, human beings and animals treated with the product and for the consumers of food products with drug residues being studied.

The experimental studies of toxicity, after Milhaud et al., (1994), are classified in 7 groups

- acute toxicity study;
- study of local irritant and allergic potential;
- study of mutagenic effect;
- subacute toxicity study;
- chronic toxicity and carcinogenic potential;
- study of embriotoxicity and adverse effect on reproduction;
- study of ecotoxicity

Medicamentele, atât cele de uz uman cât și cele de uz veterinar, precum și produsele fitosanitare, înainte de a fi introduse în uzul curent (lansate pe piață), trebuie testate din punct de vedere al inocuității și toxicității.

Prin aceste teste se evaluează riscul de îmbolnăvire pentru persoanele care fabrică, manipulează, comercializează produsul, pentru persoanele tratate și pentru consumatorii în hrana cărora ajung reziduurile din produs.

Studiile de toxicitate experimentală se clasifică în 7 grupe (Milhaud și col., 1994):

- tudiul experimental al toxicității acute;
- tudiul efectului iritant local și al sensibilizării alergice;
- tudiul efectelor mutagene;
- tudiul toxicității subacute;
- studiul toxicității pe termen lung și a efectului carcinogen;
- studiul embriotoxicității și a efectelor asupra reproducției;
- studii destinate protecției mediului.

Întrucât protocoalele de testare diferă în funcție de autor, pe plan mondial se pune problema uniformizării acestora, astfel încât testele să fie recunoscute de toate țările care comercializează produsul.

Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, care cuprinde țările puternic industrializate, a elaborat unele protocoale standard.

În studiile de toxicitate se utilizează cel mai frecvent rozătoare de laborator (șobolani, șoareci, iepuri) și carnivore.

Tendența de limitare a experimentelor pe animale a dus la dezvoltarea unor "**metode alternative**", de testare a toxicității pe culturi de celule, țesuturi sau embrioni.

Aceste metode alternative nu pot însă înlocui în totalitate testele tradiționale pe animale vii, având unele dezavantaje legate de: durata de supraviețuire a culturilor, alegerea parametrilor revelatori ai toxicității și faptul că o cultură de celule este un sistem izolat.

Toxicitatea acută exprimă efectele nefaste care se manifestă într-o perioadă dată (obișnuit 14 zile) după administrarea unei doze unice de substanță. Indicatorii cei mai utilizați pentru aprecierea toxicității acute sunt:

- doza letală 50 (DL₅₀);
- concentrația letală 50 (CL₅₀) și
- doza maximă tolerabilă (DMT).

DL₅₀ este doza unică, calculată statistic, la care mor 50% din animalele supuse experienței. Se exprimă în mg/kg.

CL₅₀ reprezintă concentrația unei substanțe, calculată statistic, care provoacă după expunerea pentru o perioadă definită, moartea a 50% din animale într-un interval de timp determinat.

DMT este doza maximă care provoacă semne de intoxicație, fără a avea efecte majore asupra supraviețuirii.

Pentru determinarea DL₅₀ se constituie loturi cât mai omogene de animale: din aceeași sușă, vârstă și greutate apropiată și repartiție egală pe sexe.

Se recomandă să se lucreze cu loturi de 10 animale (5 masculi și 5 femele).

Lotului martor i se administrează excipientul substanței de testat.

Loturilor experimentale li se administrează doze crescătoare de toxic, alese astfel încât doza cea mai mică să provoace moartea unui număr minim de animale (1-2), iar doza cea mai mare să provoace moartea majorității animalelor, dar nu a întregului lot.

Administrarea toxicului se face o singură dată, cu sonda, după o dietă de cel puțin 6 ore.

Animalele sunt cazate la o temperatură situată în zona confortului termic (22 ± 3°C), la o umiditate relativă de 30 – 70% și regim de iluminare de 12 ore/ zi. Sunt ținute în observație 14 zile, timp în care se înregistrează simptomele și mortalitatea.

Se efectuează examenul necropsic și histopatologic la animalele care au murit intoxicate. DL₅₀ se calculează statistic, prin metoda curbei etalon.

Calculul este facilitat dacă se înregistrează rezultatele pe hârtie milimetrică specială, cu scară logaritmică.

Se poate determina DL₅₀ și prin administrarea toxicului pe cale parenterală

(i.v., i.m., s.c., i.p. sau transcutanat), menționându-se calea utilizată.

Pentru substanțele gazoase sau cele care se utilizează sub formă de aerosoli, se poate determina DL₅₀ prin inhalatie, expunerea la toxic durând 4 ore.

În cazul produselor fitosanitare se impune evaluarea toxicității pentru păsări sălbatice (prepele, potârniche, rață sălbatică), pești și albine.

La păsările sălbatice testarea se face pe tineret, toxicul administrându-se fie în doze unice, fie timp de 5 zile în hrană, în concentrații crescătoare.

Alături de loturile experimentale se utilizează un lot martor negativ, care primește hrană fără toxic și un lot martor pozitiv, care primește în hrană o substanță a cărei toxicitate este cunoscută (de exemplu, dieldrin).

Toxicitatea pentru pești se exprimă prin CL₅₀ (concentrația substanței în apă, la care mor 50% din pești).

Aceasta variază în funcție de timpul de expunere (24, 48 sau 96 ore), temperatura apei, gradul de oxigenare și specia utilizată.

Cele mai sensibile sunt salmonidele: *Salmo gairdneri* (păstrăvul curcubeu) ș.a.

Toxicitatea pentru albine trebuie determinată la toate insecticidele. DL₅₀ se exprimă în μg produs/albină.

Determinarea dozei maxime tolerabile (DMT) se face prin **metoda secvențială**.

Ținând cont de informațiile disponibile privind produsul, se administrează animalelor o primă doză, care n-ar trebui să determine decât simptome minime.

După supravegherea atentă și așteptarea unui timp suficient, se administrează doze crescătoare, până când se înregistrează simptome evidente de toxicitate (fără să fie afectată supraviețuirea).

Metodele alternative, de determinare a toxicității "in vitro", pe culturi celulare, constau în aprecierea concentrației toxicului la care efectul este letal pentru celule și a concentrației la care apar anumite modificări morfologice.

Pentru reducerea numărului de animale de experiență, înainte de determinarea DL₅₀ se recomandă utilizarea "**testului limită**" ("*limit test*"). Zece animale (5 masculi și 5 femele) primesc pe o cale determinată (oral

sau parental) doza de 2 000 sau 5 000 mg/kg. Dacă nici un animal nu moare, se apreciază că DL_{50} este superioară celei utilizate.

Dacă nu moare nici un animal, se recurge la una din următoarele metode:

- determinarea intervalului de toxicitate sau
- metoda secvențială, ascendentă sau descendentă.

Determinarea intervalului de toxicitate constă în administrarea de doze crescătoare (de exemplu, 40, 200 și 1 000 mg/kg) la câte un mascul și o femelă.

În acest fel se poate aprecia că DL_{50} este situată în intervalul 40 – 200 sau 200 – 1 000 mg/kg ș.a.m.d., ceea ce permite ca la determinarea DL_{50} să se utilizeze un număr mai mic de loturi experimentale.

Metoda secvențială constă în administrarea unei doze (d) la un animal.

Dacă acesta supraviețuiește 24 ore, la un alt animal se administrează o doză superioară de 1,3 ori (d x 1,3).

Dacă și acesta supraviețuiește, se continuă cu d x 1,3 x 1,3 ș.a.m.d., până când animalul de experiență moare.

Dacă animalul a murit la prima doză (d), se continuă experiența cu o doză de 1,3 ori mai mică (d/1,3), până la doza la care animalul nu moare (Milhaud și col., 1995).

Metoda secvențială este preferabilă precedentei în pregătirea pentru determinarea DL_{50} , deoarece numărul de animale sacrificate este minim, iar intervalul de toxicitate apreciat este mic (d – d x 1,3).

Determinarea acțiunii iritante locale și a sensibilizării alergice are ca scop protejarea persoanelor care manipulează produsul, de la fabricație până la utilizare și cunoașterea reacțiilor locale ale pielii și mucoaselor, care pot surveni după utilizarea produsului.

Astfel de testări se fac îndeosebi pentru produse fitosanitare, medicamente topice, cosmetice și produse pentru igiena corporală, de uz uman.

Acțiunea iritantă asupra pielii se testează pe iepure. Se utilizează 3 – 6 animale.

Produsul de testat se aplică pe pielea intactă sau scarificată și se menține în contact 24 ore printr-un plasture, animalele fiind menținute în cuști de conținție speciale sau conținționate cu coliere speciale, care

împiedică îndepărtarea produsului prin lins. Se urmărește efectul local după o oră, 24, 48 și 72 ore.

Reacțiile cutanate (eritem și/sau edem) se notează după o grilă propusă de Draize (1971), de la 0 la 4. Dacă "scorul" este ≥ 2 (eritem bine definit, respectiv edem ușor, bine definit), produsul va purta "frază de risc" R_{38} : "**iritant pentru piele**".

Acțiunea iritantă asupra globului ocular se testează pe iepure, prin depunerea a 100 mg produs în sacul conjunctival al unui ochi.

Se închid pleoapele și se masează globul ocular 20 secunde. Ochiul congener servește ca martor.

Se urmărește efectul la o oră și zilnic, până la 7 zile. Se notează reacția corneei, irisului și a conjunctivei, după grila propusă de Draize (1971).

Dacă "scorul" este ≥ 2 pentru opacitate corneeană și/sau ≥ 1 pentru leziunile irisului și/sau ≥ 2 pentru leziunile conjunctivei, produsul poartă "frază de risc" R_{36} , "**iritant pentru ochi**".

Dacă produsul de testat este foarte iritant pentru ochi, imediat după ce se observă leziunile, globul ocular se spală cu o cantitate mare de apă.

Acțiunea iritantă pentru mucoase se testează prin aplicarea a 100 mg produs pe mucoasa peniană la iepure.

Rezultatele se citesc la 24 și 72 ore, interpretarea făcându-se după aceleași criterii ca și pentru piele.

Pentru produsele topice care necesită aplicări repetate, în special pentru cele dermatologice, se poate urmări clinic și histologic acțiunea acestora după 20 și 90 zile de utilizare.

Testele de sensibilizare alergică locală se efectuează de preferință pe cobai. Se utilizează protocoale diverse, dar indiferent de metodă, experimentul presupune două etape:

- sensibilizarea animalului, prin contacte unice sau repetate cu produsul (injecții intradermice sau aplicații locale, ca și în cazul testării acțiunii iritante);

- declanșarea reacției alergice, prin recontact cu produsul, după o perioadă de repaus de cca. 15 zile, timp în care se dezvoltă reacția imunitară.

Testarea se efectuează pe cel puțin 10 animale. Dacă cel puțin 30% reacționează pozitiv, produsul se etichetează cu X_i , purtând "frază de risc" R_{43} : "**poate determina sensibilizare prin contact cu pielea**" (Milhaud și col., 1995).

Acțiunea fototoxică, constând în capacitatea de a mări efectul razelor ultraviolete asupra pielii și **acțiunea fotoalergizantă** se testează prin aplicarea pe piele a produsului în cantitate de 1/4 - 3/4 din doza minimă capabilă de a produce eritem, urmată de iradierea cu UV și înregistrarea efectului.

În cazul substanțelor foarte acide (pH \leq 2) sau foarte alcaline (pH \geq 11,5) efectul iritant este de la sine înțeles, nefiind necesară testarea.

Produsele de acest fel sunt incluse direct în clasa X_i (iritante).

În scopul reducerii numărului de animale de experiență, se recomandă efectuarea prealabilă a testărilor pe un singur iepure.

Dacă reacțiile sunt foarte importante, nu mai este necesară utilizarea a 3 – 4 animale.

Metodele alternative nu sunt încă complet validate. Se utilizează:

- testul pe membrană corioalantoidă de embrion de găină, în vârstă de 10 zile, apreciindu-se: coagularea proteinelor în și în jurul vaselor sanguine.

Se estimează viteza apariției, gradul și dimensiunile leziunilor; testul pe ochi enucleat, constând în depunerea produsului pe cornee și urmărirea efectului clinic și histologic;

- testul pe culturi celulare, pentru materiale biomedicale (catetere, sonde, proteze). Mici bucăți de material se introduc în cultura de fibroblaste și se apreciază modificările celulare prin examen microscopic, după colorație.

Studiul toxicității subacute a medicamentelor are ca obiective:

- evidențierea efectelor nedorite care pot surveni după administrarea repetată a unui produs, ca urmare a acțiunii cumulative sau a altor mecanisme;

- precizarea naturii efectelor toxice, a organelor țintă și a timpului de reversibilitate a efectelor adverse;

- determinarea "*dozei fără nici un efect advers*".

Durata testării variază în funcție de produs, dar nu trebuie să depășească 1/10 din durata vieții animalelor de experiență.

De exemplu, pentru medicamente care se administrează timp de până la 7 zile, testarea durează 28 zile, pentru medicamente care se administrează 7 – 30 zile, testarea durează 90 zile, iar pentru medicamente care se administrează peste 30 zile, ar fi necesară testarea timp de 6 luni.

Calea de administrare diferă în funcție de calea de contaminare: orală, transcutanată sau aeriană.

Metoda cea mai uzuală este determinarea **DL₅₀ de 90 zile (DL₅₀₋₉₀)** la șobolan, pe cale orală. Ca și în cazul DL₅₀ unice, se constituie loturi omogene, cărora li se administrează doze diferite (crescătoare) de toxic.

În plus, se utilizează un "lot satelit" de minimum 10 animale, căruia i se administrează doza cea mai mare utilizată la loturile experimentale.

Acest lot se ține sub observație încă 28 zile după expirarea perioadei de 90 zile, pentru a urmări reversia manifestărilor de intoxicație. Toxicul se administrează în hrană, timp de 90 zile.

Hrana nu trebuie să conțină substanțe cu acțiune cumulativă (altele decât cea de testat), ca: micotoxine, reziduuri de pesticide etc.

Animalele se examinează clinic zilnic, urmărind *aspectul pielii, mucoaselor, globilor oculari, ritmul respirator, comportamentul, vivacitatea* etc.

Se fac cântăriri săptămânale și se determină cantitatea de furaj consumată. Se efectuează examenul oftalmologic la începutul și la sfârșitul experienței.

Se înregistrează mortalitatea pe durata experienței și **se calculează statistic DL₅₀₋₉₀**, după **metoda curbei etalon**.

Se efectuează examenul necropsic minuțios și examenul histopatologic, la toate animalele moarte, inclusiv cântărirea organelor interne.

La sfârșitul experienței se sacrifică toate animalele rămase în viață (cu excepția "lotului satelit), efectuându-se examenul hematologic și biochimic sanguin și urinar.

Examenul anatomopatologic complet (inclusiv histopatologic) se efectuează la

lotul martor și la lotul care a primit cea mai mare doză de toxic.

Rezultatele se vor exprima statistic.

Doza cea mai mare la care nu se înregistrează modificări ale nici unuia dintre parametrii menționați este considerată "**doza fără efect advers**".

La examenul anatomopatologic se acordă o atenție deosebită leziunilor care ar putea sugera efectul cancerigen al substanței: necroze hepatice și renale, hiperplazia canalelor biliare, proliferări celulare anormale, noduli de regenerare etc.

Pentru evaluarea riscului de intoxicație a personalului care manipulează produse chimice sau pesticide, se utilizează o variantă a testului constând în aplicarea toxicului pe pielea rasă (pe cel mult 1/10 din suprafața corporală), zilnic, timp de 28 zile la șobolan.

Evaluarea toxicității prin inhalatie presupune expunerea zilnică a animalelor, timp de 6 ore.

Pentru evaluarea **neurotoxicității întârziate** a organofosforicelor Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică recomandă **testul de 90 zile, pe găini adulte**. Se constituie loturi de 6 găini adulte (de 9 luni), care n-au fost crescute în baterii și nu prezintă tulburări locomotorii.

Se administrează oral sau injectabil câte o singură doză de toxic, situată în jurul DL_{50} , astfel încât una din doze să permită supraviețuirea a cel puțin 3 păsări, timp de 21 zile. După 21 zile se repetă administrarea aceleiași doze.

Nu se iau în considerare manifestările de intoxicație acută, care apar până la 48 – 72 ore de la administrare.

Pentru prevenirea mortalității este permis tratamentul cu atropină.

Se notează tulburările locomotorii care apar între a 3-a și a 21-a zi, după fiecare administrare.

La sfârșitul perioadei de 90 zile, păsările se sacrifică și se examinează histologic măduva spinării și nervii sciatici, pentru a exclude tulburările locomotorii datorate bolii lui Marek.

Pentru **evaluarea acțiunii cumulative** a unui toxic se calculează **indicele de cronicitate** (IC), reprezentând raportul dintre DL_{50} și DL_{50-90} . Teoretic, IC poate avea valori cuprinse între 1 – 90. În practică însă nu

există substanțe total necumulative (IC = 1), nici substanțe total cumulative (IC = 90).

Convențional se consideră că sunt cumulative substanțele cu $IC \geq 2$. Printre cele mai cumulative toxice se numără raticidele cumarinice (Warfarina, IC = 20,8), unele chimiosterilizante (Metepa, IC = 18,1), insecticidele organoclorurate (Dieldrin, IC = 12,8) etc.

Determinarea acțiunii mutagene.

Mutațiile pot afecta celulele germinative sau somatice.

Primele se transmit la descendenți, putând determina apariția de anomalii (teratogeneză).

Mutațiile somatice pot duce la dezvoltarea tumorilor maligne, existând o **strânsă corelație între acțiunea mutagenă și acțiunea cancerigenă**.

Această observație a permis înlocuirea testelor de carcinogenitate pe animale de laborator, care sunt costisitoare și necesită timp îndelungat, cu testele de mutageneză (Hayes, 1989; Milhaud și col., 1994).

Se cunosc trei tipuri de teste de mutageneză:

- teste de mutații genice;
- teste de mutații cromozomiale;
- teste de explorare a mecanismelor de reparație a AND.

Dintre testele de mutații genice, cel mai cunoscut este testul propus de **Ames și Mc. Cann** (1976), constând în utilizarea unor sușe de *Salmonella typhimurium* (T_{98} , T_{100} , TA_{1535} , TA_{1537}), care nu se pot dezvolta pe medii fără histidină.

Într-o placă Petri (martor) cu mediu de cultură solid, lipsit de histidină, se însămânțează 10^9 bacterii.

În alte 3 plăci cu același mediu nutritiv se plasează rozete sau godeuri cu concentrații diferite ale substanței de testat și se însămânțează, aceeași tulpină de *S. typhimurium*, în aceeași doză ca și în placa martor.

După incubarea la 37°C, 24 ore, în placa martor se dezvoltă 10 – 30 colonii, datorită apariției de mutante spontane (*revertante*), capabile să se dezvolte fără histidină.

Testul este pozitiv (substanța este mutagenă) dacă în plăcile care conțin substanța de testat se dezvoltă un număr mare de colonii (*revertante*), proporțional cu concentrația substanței.

Pentru aprecierea mai fidelă a efectului mutagen asupra mamiferelor, se utilizează teste pe linii standard de culturi celulare de hamster, șoarece sau om.

Testele pentru evidențierea mutațiilor cromozomiale și testele de explorare a mecanismelor de reparație a AND sunt mai laborioase și necesită experiență în domeniul citogeneticii, dar legislația europeană impune efectuarea lor pentru medicamentele de uz uman.

Mutațiile cromozomiale pot fi depistate prin prelevarea de celule din măduva osoasă a unui hamster tratat și evidențierea anomaliilor cromozomiale sau, mai simplu, prin aprecierea proporției de eritrocite tinere în care persistă resturi nucleare.

Studiul toxicității pe termen lung și a efectului cancerigen are aceleași obiective ca și metoda anterioară, iar protocolul utilizat este apropiat celui pentru DL₅₀₋₉₀.

Administrarea toxicului și înregistrarea efectelor durează mai mult de 1/10 din viața animalelor de experiență: 6 luni, 1 an sau 2 ani.

Examenle oftalmologice, biochimice și hematologice se efectuează din 3 în 3 luni sau din 6 în 6 luni, când studiul durează 2 ani. Reversibilitatea efectelor toxice se urmărește la "lotul satelit", care a primit doza cea mai mare de toxic.

La sfârșitul perioadei experimentale se sacrifică 50% din supraviețuitori, se înregistrează leziunile, iar după cel puțin 28 zile se sacrifică restul efectivului, urmărindu-se capacitatea de regenerare a organelor lezate.

Studiul fiind foarte costisitor, se utilizează doar pentru substanțe cu efecte toxice tardive, puternic cumulative sau care determină anumite efecte particulare, puțin cunoscute.

Testarea acțiunii cancerigene necesită un protocol riguros și foarte costisitor, impunând măsuri deosebite privind:

puritatea produsului de testat și calitatea hranei administrate;

cunoașterea susceptibilității sușei de animale de experiență față de tumori spontane;

profilaxia bolilor infecțioase: utilizarea de animale indemne de germeni patogeni, cuști sterilizate, ventilația cu aer filtrat și tratat cu UV etc (Hayes, 1989).

Loturile experimentale sunt constituite din cel puțin 50 animale, separate pe sexe.

Supravegherea animalelor se efectuează **pe toată durata vieții** (convențional, 18 luni la șoareci și 2 ani la șobolani) sau până când mor 75 – 80% din animale, din fiecare lot. Se efectuează examene hematologice și biochimice periodice, iar animalele moarte sau sacrificate se examinează anatomo- și histopatologic.

Astfel de studii se efectuează doar atunci când sunt cu adevărat indispensabile, luând în considerare:

- structura produsului;
- rezultatele testelor de mutagenază;
- rezultatele observațiilor din cadrul determinării DL₅₀₋₉₀;
- condițiile de utilizare și indicațiile produsului.

Ca **metode alternative** se utilizează testele de carcinogeneză pe pești (plătică, păstrăv), la care se dezvoltă ușor tumori hepatice și teste pe scoici, care pot concentra toxicele.

Studiul embriotoxicității și al efectelor asupra reproducerii. În cazul substanțelor susceptibile de a fi toxice pentru embrioni sau feteți se urmăresc: **embrioletalitatea și teratogenitatea.**

Embriotoxicitatea se exercită cel mai bine în perioada multiplicării zigotului (blastulă), scăzând odată cu avansarea gestației.

Teratogeneza, tradusă prin apariția de malformații, se manifestă doar în perioada de organogeneză (în prima treime a gestației).

La femelele domestice, perioada de sensibilitate la produsele teratogene este situată între a 5-a – a 15-a zi de gestație la pisică, între a 8-a – a 24-a zi la cățea, a 9-a – a 35-a zi la la scoafă și până în a 3-a săptămână la oaie. La femeie, perioada de risc maxim este între a 13-a – a 50-a zi.

Embrioletalitatea poate masca uneori teratogenitatea, cele două efecte fiind strâns legate.

Testarea teratogenității se face pe loturi de 20 șobolance sau șoricioaice gestante, sau pe 12 – 20 iepuroaice. Toxicul se administrează o singură dată, între zilele 3 – 15 de gestație la șoricioaică și șobolancă și între zilele 6 – 18 de gestație la iepuroaică.

Femelele se sacrifică înainte de data fătării (ziua a 18-a la șoricioaică, a 19-a la șobolancă și a 28-a la iepuroaică, pentru a evita consumul nou-născuților malformați de către femele.

Se înregistrează: numărul de corpi galbeni, numărul de fetoși vii, fetoși morți, resorbții embrionare, greutatea fetoșilor și a placentelor.

Se efectuează examenul extern al fetoșilor, cu lupa, după care aceștia sunt împărțiți în două loturi.

Jumătate din fetoși sunt imersați în lichid Bouin, apoi sunt secționati transversal, pentru evidențierea anomaliilor organelor interne.

Al doilea lot este cufundat în alcool de 70°C, supus unui tratament alcalin, care face țesuturile moi transparente, apoi se efectuează colorația cu alizarină.

Colorantul se fixează pe schelet, evidențiind anomaliile acestuia și tulburările de osificare.

Efectele toxicelor asupra reproducerii mai sunt urmărite prin:

- studierea parametrilor reproducerii pe mai multe generații;
- studierea fecundității la masculi și femele;
- urmărirea toxicității asupra fetoșului în perioada peri- și postnatală.

Dintre **metodele alternative**, cele mai bune rezultate se obțin prin **testele pe culturi de embrioni de mamifere**. Cei mai utilizați sunt embrionii de șobolancă, prelevați în ziua a 9-a de gestație.

Embrionii se cultivă timp de 48 ore "in vitro", în mediu cu substanța de testat. Tulburările de dezvoltare se pot decela prin examinare cu lupa.

Dacă produsul de testat nu este solubil în mediu sau nu penetrează embrionii, rezultatele pot fi fals negative.

S-au mai propus teste de embriotoxicitate efectuate pe ouă sau amfibieni, pești, insecte, moluște, însă nu sunt încă validate.

Studiul efectelor toxice asupra sistemului imunitar. Sunt cunoscute efectele imunosupresoare sau imunotoxice ale unor medicamente (tetraciline, aminoazide, cloramfenicol, fenobarbital clorpromazină) și toxice exogene: Pb, Hg,

Cd, hidrocarburi aromatice halogenate etc. Imunotoxicitatea se manifestă prin:

- scăderea rezistenței la infecții experimentale sau la implantul de tumori;
- perturbarea maturării și diferențierii limfocitelor T;
- inversarea raportului CD_4^+/CD_8^+ ;
- efect toxic direct asupra macrofagelor;
- inhibiția funcțiilor polinuclearelor neutrofile;
- scăderea concentrației unor imunoglobuline și
- creșterea incidenței leucemiei acute (Hayes, 1989; Milhaud și col., 1994).

Pentru evidențierea efectului imunosupresor, Descotes (1992) a propus 3 etape:

- etapa de "screening" primar;
- etapa evaluării funcționale a răspunsului imun;
- confirmarea perturbărilor funcționale.

Prima etapă se realizează odată cu testarea toxicității subacute sau cronice (DL_{50-90}), pe baza numeroșilor parametri studiați cu această ocazie.

Se poate suspecta efectul imunotoxic al produsului de testat, pe baza următoarelor date:

- modificările ponderale și morfologice ale organelor interne;
- examene imunohistochimice ale țesuturilor limfoide;
- numărul eritrocitelor și formula leucocitară;
- dozarea imunoglobulinelor serice;
- numărul leucocitelor și al subpopulațiilor limfocitare: limfocite B, Th (CD_4^+), Ts (CD_8^+).

În etapa a II-a se efectuează teste specifice pentru imunitatea umorală și celulară, "in vitro" și "in vivo".

În etapa a III-a se utilizează fie teste complementare celor din etapa a II-a, fie verificarea "in vivo" a rezistenței la infecții sau la tumori implantate.

Teste de ecotoxicitate. Aprecierea efectelor nocive ale pesticidelor și ale diversilor poluanți chimici asupra mediului înconjurător se realizează prin trei categorii de teste de ecotoxicitate:

- **teste simple, de ecotoxicitate directă;**
- **teste integrate;**
- **teste în condiții "de teren" (în ecosisteme naturale).**

Studiile de ecotoxicitate urmăresc evidențierea efectelor nocive induse direct, de către produsul de testat, ca și a acțiunii metabolizării acestuia, a capacității de acumulare și în special de **“magnificație” biologică** (creșterea succesivă a concentrației reziduurilor în lungul lanțurilor trofice).

S-a stabilit existența unei corelații între proprietățile fizico-chimice ale substanțelor (solubilitate, tensiune superficială, rezistența la reacții de hidroliză și oxido-reducere) și acțiunea lor asupra mediului.

Testele de ecotoxicitate directă constau în urmărirea efectului produsului de testat asupra unei singure specii, întreținută într-un biotop simplificat (artificial).

Cel mai frecvent se utilizează organisme acvatice: alge, purici de baltă (*Daphnia magna*), pești (păstrăv, crap etc.).

Se determină concentrația în apă a produsului, la care este inhibată dezvoltarea a 50% din indivizi (**CI₅₀**) sau concentrația letală pentru 50% din indivizi (**CL₅₀**).

În funcție de durata expunerii există teste de ecotoxicitate imediată (expunere de 24 – 96 ore) și teste pe termen mediu (expunere de 14 – 28 zile).

Testele integrate urmăresc efectul toxicului asupra unor microecosisteme artificiale sau asupra unor lanțuri trofice.

De exemplu, se introduce toxicul în bălți artificiale cu o suprafață determinată (cca. 50m²), în anumite concentrații, urmărindu-se acțiunea asupra ecosistemului pe o perioadă de 3 luni – 1 an, comparativ cu o baltă martor, fără toxic.

Se mai pot utiliza cuști din grilaj metalic care separă anumite specii de restul ecosistemului.

Studiile de ecotoxicitate în condiții de teren se fac după aplicarea produsului de testat pe anumite culturi agricole, urmărindu-se efectele asupra faunei utile și asupra celei dăunătoare.

În cadrul studiilor de ecotoxicitate se mai urmărește procesul de **biodegradare** și de **bioacumulare** a toxicului.

Produsele care se biodegradează în proporție de peste 70% în 28 zile sunt considerate ușor biodegradabile.

Bioacumularea este corelată direct cu liposolubilitatea.

Comportamentul toxicului în sol depinde de proprietățile fizico-chimice și încărcătura în substanțe organice ale acestuia.

Se efectuează studii privind adsorbția toxicului, spălarea acestuia pe coloane de sol, fotodegradarea, metabolizarea, timpul de înjumătățire, influența asupra biomasei solului etc.

BIBLIOGRAFIE

1. **Boiseau J.**-Le controle des residus de medicaments veterinaires dans les denrees alimentaires d'origine animale-18^{es} Journees Nationales des GTV, Paris, 6-7 oct 1989, 15-21
2. **Both N.H., Mc Donald L.E.** -*Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 6thed, ISU Press, Ames, Iowa, 1997
3. **Burgat Sacaze V., Benard P., Petit C., Guerre P., Dossin O.**- *Impact subletal des polluants sur l'environnement: exemple du DDT. Revue Med. Vet.* 1993, 144, 6, 515-522
4. **Cristina R.T.** -*Farmaceutică și terapeutică veterinară*, Ed. Agerpress Typo, Timișoara, 1999
5. **Crivineanu V., Râpeanu M., Crivineanu Maria** - *Toxicologie sanitară-veterinară*, Ed.Coral Sanivet, București, 1995
6. **Milhaud G.E.** - *Evoluation de l'innocuite (medicaments veterinaires, anabolisants, pesticides)* E.N.V. Alfort, U.P. de Pharmacie et Toxicologie, 1994-1995
7. **Milhaud G.E.** et col.-*Les toxiques neurotropes*.E.N.V. Alfort, U.P. de Pharmacie et Toxicologie, 1995
8. **Mosha R.D.**- *The toxicology of organophosphorus insecticides: a review.* Veterinary Bulletin, 1993, 63, 11, 1039-1050
9. **Radostis, O. M.; Blood, D. C.; Gay, J.** 2000, *Veterinary Medicine* Bailliere Tindall, New York
10. **Solcan Gh., Beșchea Chiriac I. S.** - *Toxicologie veterinară – manual practic.* Ed. Tehnopress, Iași, 2005;
11. **Șuțeanu E., Danielescu N., Popescu O., Trif Alexandra** - *Toxicologie și toxicoze.* Ed. Did. și Pedagog., București, 1995
12. **xxx** Comitetul Tehnic de Omologare a Metodelor de Diagnostic Paraclinic Veterinar-*Metode Toxicologice* LCSVD București, 1998.