

PESTYCYDY ŚRODKI CIEZYNFEKCYJNE DEZYNSEKCYJNE DERATYZACYJNE	N O R M A    B R A N Ż O W A	BN-66 6052-07 <i>As. kah.</i> <i>x 16</i>
	BIOLOGICZNA METODA OZNACZANIA OSTREJ TOKSYCZNOŚCI DOUSTNEJ PESTYCYDÓW NA SZCZURACH	

### 1. WSTĘP

1.1. Przedmiot normy. Przedmiotem normy jest biologiczna metoda oznaczania toksyczności ostrej doustnej pestycydów na szczurach na podstawie średniej dawki  $LD_{50}$  wyrażonej w mg/kg wagi ciała.

1.2. Zastosowanie. - Do klasyfikacji toksyczności podstawowych substancji czynnych środków ochrony roślin oraz form użytkowych pestycydów.

1.3. Dokumenty związane. Weil C.S. - "Calculation of Median - Effective Dose", Biometrics, September 1952, 255-263. /Tabele załączone/

### 2. METODA OZNACZANIA

#### 2.1. Materiały

- a/ strzykawki lekarskie od 1 ml do 10 ml - w zależności od objętości podawanego roztworu,
- b/ sonda /igła do iniekcji nr 7, lekko wygięta, zakończona kulką z cyny/.

2.2. Zwierzę testowe. Szyszury białe lub kapturowe jednej płci, względnie obu w równej liczbie w serii doświadczalnej, w wieku od 3 do 6 miesięcy, o wadze od 150 do 350 g.

#### 2.3. Odczynniki

- a/ oleje roślinne jadalne /arachidowy, kukurydziany, oliwkowy/,
- b/ woda destylowana,
- c/ lecytyna,
- d/ tyloza,

Zgłoszona przez  
Państwowy Zakład Higieny  
Zakład Dezynfekcji  
Dezynsekcji  
Deratyzacji

Ustanowiona przez Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej dnia 12.5.1966 r. jako norma obowiązująca w zakresie metod badań od dnia ~~1.3.1966 r.~~ 22.11.1966 r.

/Mon. Pol. Nr *72/966* poz. *336* /

2.4. Roztwory. Do oznaczeń używa się wodnych lub olejowych roztworów badanego środka w czterech stężeniach, przygotowanych wg postępu geometrycznego. Stężenie należy tak dobrać, aby działanie trujące powodowało śmiertelności mieszczące się w granicach przewidzianych przez tabele /kolumna r/. W tym celu przeprowadza się badanie wstępne na 8 szczurach, biorąc na jedno stężenie 1/2 osobniki. Ilość roztworu, zawiesiny lub emulsji badanego środka oblicza się w założeniu, że na 150 g szczura przypada 0,5 ml przy substancjach silnie toksycznych, natomiast 5 ml przy substancjach mało toksycznych. Przy ilości 5 ml jako rozpuszczalnika nie można używać oleju jadalnego. Wstępne badania należy uznać za udane jeżeli śmiertelności na poszczególnych poziomach dawkowania znajdą swój wariant w niżej zamieszczonej tabelicy.

Tablica 1

Zestawienie śmiertelności wymaganych  
w doświadczeniu wstępnym

Poziom dawkowania			
I	II	III	IV
0	0	1	2
0	0	2	2
0	1	1	2
1	0	1	2
1	0	2	2
1	1	1	2
0	0	2	1
0	1	1	1
0	1	2	1

2.4.1. Przygotowanie roztworów. Naważki badanej substancji przygotowano dla czterech kolejnych stężeń określonych szacunkowo w badaniu wstępnym,

rozpuszcza się w 100 ml porcjach rozpuszczalnika, w przypadku trudno rozpuszczalnej substancji - mieszaninę należy lekko podgrzewać do momentu rozpuszczenia substancji.

2.4.2. Przygotowanie zawiesin. Naważki badanej substancji przygotowane dla czterech kolejnych stężeń określonych szacunkowo w badaniu wstępnym w postaci subtelnie rozstartego proszku /proszek winien przechodzić przez sito o średnicy oczek 0,15 mm - sito nr 6 wg Farmakopei Polskiej/ zawiesić w 100 ml 1-4% koloidalnego roztworu wodnego tylozy.

2.4.<sup>3</sup> Przygotowanie emulsji. Subtelnie rozdrobnione naważki badanej substancji przygotowane dla czterech kolejnych stężeń /określonych szacunkowo w badaniach wstępnych/ wprowadzić do 100 ml cylindrów miarowych z doszlifowanym korkiem, zawierających 15 ml oleju jadalnego z dodatkiem 0,75 g lecytyny. Całość należy dobrze wymieszać i uzupełnić wodą destylowaną do 100 ml. Emulgować krótko przed zadaniem dawki testowej.

2.5. Sposób obliczania. Partię zwierząt doświadczalnych przeznaczonych do badań należy przetrzymać w hodowli przez okres 10-12 dni w celu sprawdzenia ich stanu zdrowotnego i adaptacji. Następnie wyselekcjonowane zwierzęta umieszcza się x na okres 12-1<sup>8</sup> godzin pojedynczo w klatkach zaopatrzonych w butelki z wodą, celem przegłodzenia. Na jedno stężenie przeznacza się 10 szczurów. Temperatura i wilgotność powietrza w pomieszczeniu w czasie badań powinna być w przybliżeniu taka jak w okresie adaptacji zwierząt. Równocześnie należy wykonać próbę kontrolną, licząc nie równą grupie badanej.

2.5.1. Sposób podania roztworu badanego środka. Do strzykawkii lekarskiej z wmontowaną metalową sondą nakiera się 0,5 względnie 5 ml badanego roztworu dla szczura o wadze 150 g. Lewą dłoń chwytając zwierzę od strony grzbietowej w ten sposób, aby palcem wskazującym i kciukiem silnie naciągnąć skórę w okolicy szyjnej, a pozostałymi palcami nacisnąć część brzuszną. Tak uchwytane zwierzę odwraca się. Sondę należy wsunąć do pyszczka od strony prawej. Prawidłowo podana sonda powinna wejść lekko. W przypadku wyczucia oporu manipulację należy przerwać, gdyż wciskając sondę "siłą" można trafić do tchawicy i spowodować śmierć zwierzęcia przez uduszenie. Po podaniu preparatu klatki zaopatruje się w dostateczną ilość karmy. Śmiertelność notuje się po upływie 24 do 48 godzin od chwili podania. W przypadku wolno działającego środka śmiertelność notuje się po upływie 96 godzin. Obserwacje zwierząt prowadzi się przez

2 tygodnie, aby móc wykryć wypadki opóźnionej toksyczności.

2.5.2. Przykład oznaczania toksyczności ostrej dieldrinu. Na podstawie badań wstępnych ustalono następujące stężenie roztworów: I, 5,1 g/100 ml, II, 3,2 g/100 ml, III, 2 g/100 ml i IV, 1,25 g/100 ml - /mnożnik postępu geometrycznego = 1,6/ - powodujące przy 0,5 ml na 150 g wagi szczura dla odpowiednich stężeń śmiertelności wynoszące: przy stężeniu I - 100%, II - 60%, III- 40%, IV - 0%.

Dla ułatwienia dawkowania substancji sporządza się tabelkę wagi zwierząt i oblicza ilości mililitrów przypadające na określony ciężar zwierzęcia.

Tablica 2

ciężar w g	150	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200
ml szczura	0,50	0,52	0,5 <sup>3</sup> <sub>5</sub>	0,55	0,57	0,58	0,60	0,62	0,63	0,65	0,67

Dawkę wyrażoną w ml/szczura należy przeliczyć na mg/kg wagi ciała.

Dane liczbowe przykładowego doświadczenia wstawia się w tablicę 3 kolumny 1,3,4.

Tablica 3

1	2	3	4
Stęż. g/100ml	Dawka mg/kg	Liczba zwierz.	Liczba padłych
1,25	41,6	10	0
2,00	66,5	10	4
3,20	106,7	10	6
5,10	169,2	10	10

Obliczną średnią dawkę w mg/kg dla każdego stężenia umieszcza się w kolumnie 2 Tab. 3.

2.5.3. Obliczenia. Wyniki badań oblicza się posługując się następującymi zależnościami:

$$\log m = \log Da + d/f + 1/$$

gdzie:

m - przeciętna  $ID_{50}$  w mg/kg,

Da - log najniższej dawki,

d - log mnożnika dawek /mnożnik postępu geometrycznego/,

f - zmienny czynnik odczytywany z tablic.

Granice ufności  $ID_{50}$  dla prawdopodobieństwa 0,95 oblicza się z wzoru:

$$\log ID_{50} = \log m \pm 2 \hat{\sigma} \log m$$

gdzie:

$$\hat{\sigma} \log m = d \cdot \hat{\sigma} f$$

$\hat{\sigma} f$  = współczynnik odczytywany z tablic

#### 2.5.4. Przykład obliczenia

Odczyty z tablic:

dla kombinacji 0 4 6 10 /kolumna 4, tab. 3/  
odczytuje się z załączonych tablic wartości  
f i  $\hat{\sigma} f$

$$f = 0,50000$$

$$\hat{\sigma} f = 0,23094$$

Odczytywane wartości podstawia się do wzoru:

$$\log m = \log Da = d/f + 1/ = 1,6191 + 0,2041/0,50000 + 1 = \underline{1,92525}$$

$$\log ID_{50} = \log m \pm 2 \hat{\sigma} \log m = 1,92525 \pm 0,0942 = 84,2/67,8 \text{ do } 104/$$

$$ID_{50} = 84,2 \text{ mg/kg.}$$

K O N I E C