

---

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ  
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION  
(ISC)

---

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
СТАНДАРТ

ГОСТ  
33059—  
2014

---

**МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ  
ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ  
ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

**Птицы: тест на острую пероральную токсичность**

Издание официальное



Москва  
Стандартинформ  
2019

## Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

### Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский центр стандартизации, информации и сертификации сырья, материалов и веществ» (ФГУП «ВНИЦСМВ») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии документа, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 20 октября 2014 г. № 71-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004--97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004--97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Азербайджан	AZ	Азстандарт
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 25 ноября 2014 г. № 1749-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33059—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2015 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD, Test № 223:2010 «Птицы: тест на острую пероральную токсичность» («Avian Acute Oral Toxicity Test», IDT).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного документа для приведения в соответствие с ГОСТ Р 1.5 (подраздел 3.6)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Апрель 2019 г.

*Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.*

*В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»*

© Стандартиформ, оформление, 2015, 2019



В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

## Содержание

1 Исходные предпосылки .....	1
2 Область применения .....	3
3 Термины и определения .....	3
4 Принцип теста .....	4
5 Достоверность теста .....	5
6 Описание теста .....	5
7 Процедура теста .....	7
8 Данные и отчет о проведении теста .....	13
Приложение А (рекомендуемое) Общая характеристика, обоснование и статистические основы последовательной схемы эксперимента .....	15
Приложение В (рекомендуемое) Определение числа частичных смертей и возвратов .....	17
Приложение С (рекомендуемое) Расчет рабочих величин $LD_{50}$ в случаях, когда смертность насту- пает в опыте с предельной дозой .....	18
Библиография .....	19

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ  
ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

## Птицы: тест на острую пероральную токсичность

Test methods for chemicals of environmental hazard. Avian acute oral toxicity test

Дата введения — 2015—08—01

## 1 Исходные предположки

1.1 Информация, необходимая для осуществления различных схем оценки опасности, может существенно варьироваться. Для осуществления схем оценки опасности применяют три варианта теста:

- тест предельной дозы — предпочтителен, если токсичность вещества предположительно низкая и летальный исход при величине предельной дозы маловероятен. Предельная доза должна соответствовать целям оценки, и она обычно не превышает 2000 мг/кг веса птицы. Для теста используют 5—10 птиц дополнительно к контрольной группе (рисунок 1):

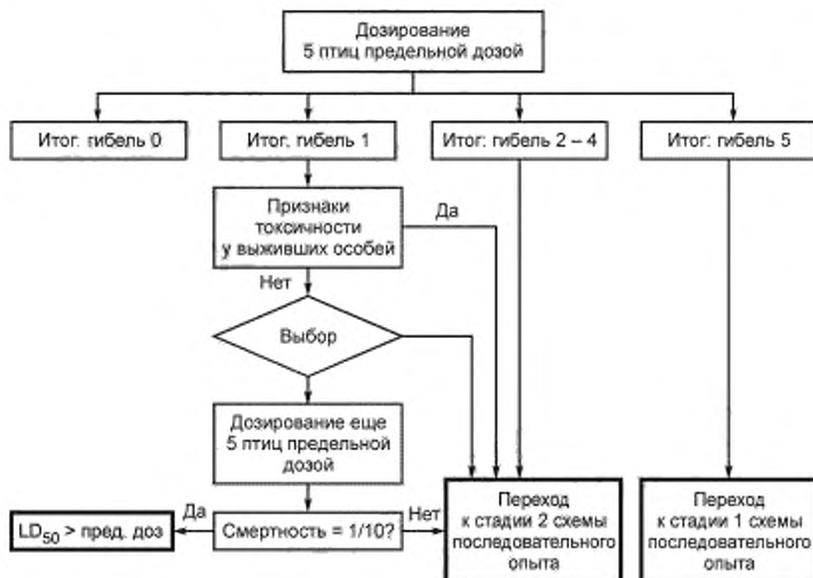


Рисунок 1 — Опыт по определению предельной дозы (схема не включает контрольных птиц)

- градиентный  $LD_{50}$ -тест — предпочтителен, если регулирующие или иные требования предусматривают необходимость получения кривой доза-отклик и/или доверительных интервалов установленных величин помимо значений  $LD_{50}$ . Опыт проводят в 3—4 этапа с 24—34 птицами дополнительно к контрольной группе (рисунок 2)<sup>1)</sup>;

- обычный  $LD_{50}$ -тест — предпочтителен, если регулирующие или иные требования предусматривают необходимость оценки только величины летальной дозы (медианного значения), а кривая доза-отклик и доверительные интервалы  $LD_{50}$  при этом не требуются. Это может быть соответствующий опыт для установления чувствительности видов к веществу (по величинам  $LD_{50}$ ) или получения информации, необходимой для маркировки продукта. В данном варианте опыта предусмотрено два этапа и используют 14 птиц помимо контрольной группы (рисунок 2).

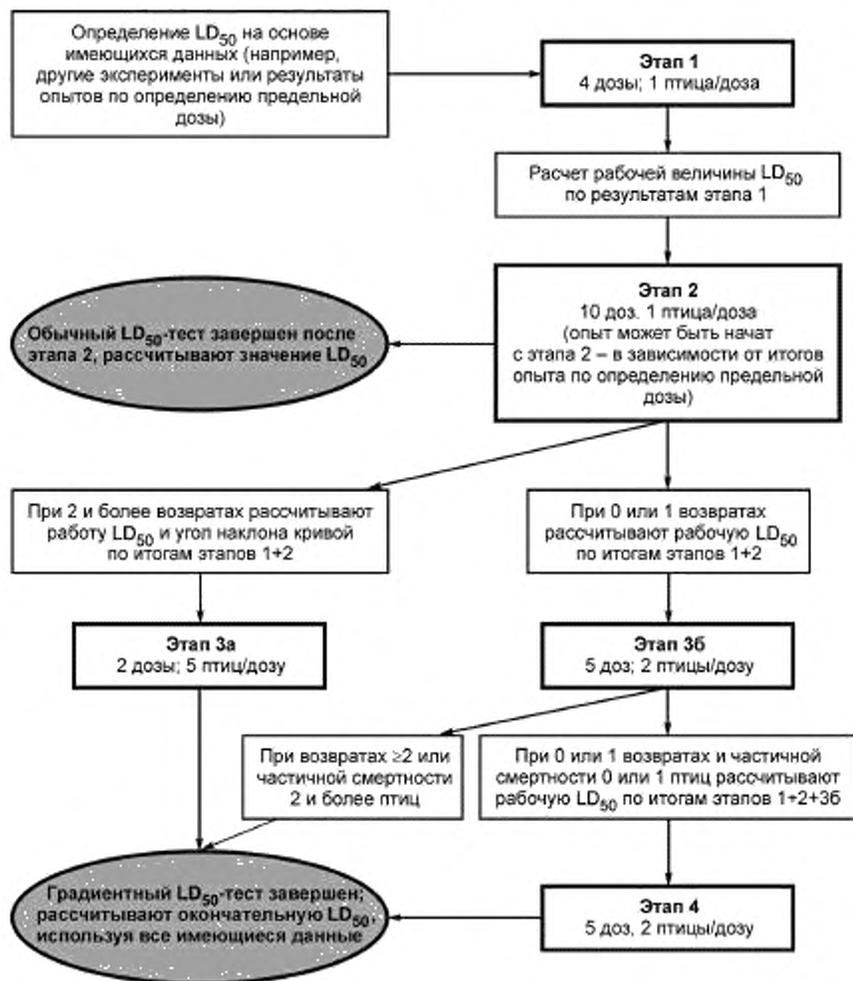


Рисунок 2 — Схема последовательного теста (градиентный  $LD_{50}$ - и обычный  $LD_{50}$ -тесты); схема не включает в себя птиц контрольного опыта. Остальные детали, касающиеся правил остановки опыта, приведены в 7.2.2.2—7.2.2.5

<sup>1)</sup> При необходимости получения кривой доза-отклик допускается использовать классический вариант проведения этого опыта (см. USEPA OPPTS 850.2100). В целях обеспечения защиты животных методы, использующие большее число подопытных птиц (такие, как USEPA OPPTS 850.2100), не рекомендуются.

1.2 Градиентный и обычный  $LD_{50}$ -тесты включают последовательно осуществляемые этапы (рисунок 2). Этапы — это периоды в ходе опыта, когда птицам одновременно дают дозу вещества и затем наблюдают их в течение некоторого времени. Таким образом, термины «последовательный опыт» и «последовательная схема», используемые ниже, относятся как к градиентному, так и к обычному  $LD_{50}$ -тестам. Объяснения логики построения опытов и их статистическое обоснование приведены в приложении А.

1.3 Схема градиентного теста предусматривает получение показателей, оценивающих величину риска посредством применения расширенной процедуры компьютерного моделирования [2]. Эти показатели включают в себя расчет  $LD_{50}$ , доверительных интервалов и крутизны кривой доза-отклик.

1.4 На каждом этапе градиентного и обычного  $LD_{50}$ -тестов, одной или нескольким птицам перорально вводят одну дозу тестируемого вещества, при этом используют такие дозы, которые предположительно позволят определить рабочее значение  $LD_{50}$ . Птиц наблюдают в течение 14 дней, но выбор доз для следующей стадии опыта основывается на смертности и видимых признаках интоксикации, возникающих в течение трех дней. Данный интервал может быть уменьшен, если смертность или признаки восстановления проявляются быстро, или увеличен, если наблюдается или ожидается гибель птиц в более отдаленные сроки.

1.5 Для последовательных тестов (градиентного и обычного) могут быть использованы данные неудачных вариантов тестов по определению предельной дозы (гибель одной или более птиц), а также информация из внешних источников. Для веществ с ожидаемой высокой токсичностью тестирование может быть начато с этапа 1, когда каждой из четырех птиц дают разные дозы вещества, базирующиеся на оптимально доступных значениях  $LD_{50}$  (например, на данных, полученных для грызунов или других видов птиц). Основываясь на итогах этапа 1, определяют рабочую (прикидочную) величину  $LD_{50}$ . Для выбора доз этапа 2 используют расчеты по принципу максимального правдоподобия (Maximum Likelihood Estimation (MLE)), при этом каждая из рассчитанных таким образом 10 доз дается одной птице. Если рабочая величина  $LD_{50}$  взята из неудачных вариантов опытов по определению предельной дозы, то последовательный опыт может быть начат с этапа 2. Для градиентного  $LD_{50}$ -теста далее проводят этап 3 и, возможно, этап 4 (правила остановки опыта подробно описаны в 7.2.2.2—7.2.2.5).

## 2 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения острой пероральной токсичности химических веществ для птиц.

## 3 Термины и определения

В настоящем стандарте применимы термины со следующими определениями:

3.1 **острая пероральная токсичность** (acute oral toxicity): Неблагоприятные эффекты, возникающие после перорального введения птицам одной или нескольких доз вещества в течение 24 ч.

3.2 **доза** (dose): Количество вводимого тестируемого вещества.

**Примечание** — Доза выражается в массе (г, мг) либо как масса тестируемого вещества на единицу массы тела подопытного животного (например, мг/кг массы тела).

3.3  **$LD_{50}$  (полулетальная пероральная доза)** (median lethal oral dose): Статистически полученное значение однократной дозы вещества, которая предположительно приводит к гибели 50 % подопытных животных при введении пероральным путем.

**Примечание** — Значение  $LD_{50}$  выражают в единицах массы тестируемого вещества на единицу массы подопытного животного (мг/кг массы тела).

3.4 **предельная доза** (limit dose). Доза верхнего предела тестирования.

3.5 **пробит** (probit): Аббревиатура термина «probability integral transformation»; пробит-модель зависимости доза-отклик позволяет описать стандартное нормальное распределение (то есть центрированное относительно среднего и масштабированное по его стандартному отклонению) ожидаемых откликов на дозы (обычно в логарифмической шкале), как если бы зависимость выражалась прямой линией с наклоном, равным обратной величине стандартного отклонения. Стандартное нормальное распределение летальности симметрично, а значит, его среднее значение также представляет собой среднее или медианное значение  $LD_{50}$ .

3.6 **наклон кривой доза-отклик** (slope of the dose-response curve): Величина угла наклона кривой доза-отклик относительно оси дозы. В случае пробит-анализа, когда отклики анализируют в координатах пробит-логарифма дозы, эта зависимость будет выражена прямой, а ее наклон — обратной величиной от стандартного отклонения толерантностей, полученных на тестируемых объектах, которые предположительно имеют нормальное распределение.

3.7 **этап (в последовательной схеме)** (stage in a sequential design): Временной интервал в течение эксперимента, в котором определенное количество птиц дозируют одновременно и наблюдают в течение некоторого периода времени. На разработку схемы каждого конкретного этапа могут влиять предварительные оценки величин  $LD_{50}$  и наклона кривой доза-отклик, полученные по результатам предыдущих этапов эксперимента. Аналогичным образом данные, полученные на каждом этапе, могут повлиять на разработку схемы для последующих этапов.

3.8 **ldose**: Минимальная доза, вводимая на данном этапе (мг/кг массы тела).

3.9 **hdose**: Максимальная доза, вводимая на данном этапе (мг/кг массы тела).

3.10 **step**: Шаг (множитель) для расчета отдельных доз.

3.11 **первичная оценка  $LD_{50}$**  (initial estimate of the  $LD_{50}$ ): Величина, имеющаяся (полученная) до начала испытания, вокруг которой группируют четыре дозы для этапа 1.

3.12 **рабочая оценка  $LD_{50}$  и наклона кривой доза-отклик** (working estimate of  $LD_{50}$  and slope): Предварительные величины, полученные до завершения этапа и используемые для определения доз для последующих этапов. Обычно рабочие оценки основаны на итогах наблюдений на всех начатых этапах, полученных на их третий день.

3.13 **окончательная оценка  $LD_{50}$  и наклона кривой доза-отклик** (final estimates of  $LD_{50}$  and slope): Величины, которые рассчитывают после окончания эксперимента. Они основаны на итогах наблюдений каждого законченного этапа, обычно продолжавшегося 14 дней или дольше.

3.14 **частичная гибель** (partial kills): Ситуация, когда при введении одинаковых доз нескольким птицам некоторые из них погибают, а некоторые выживают. Частичную гибель иногда называют частичным откликом.

3.15 **возвраты** (reversals): Ситуации, являющиеся аналогом частичной гибели, встречающиеся в опыте без повторностей (для отдельных птиц) и в последовательных парах птиц, когда более низкие дозы приводят к гибели, в то время как при более высоких дозах наблюдается выживание. Это, вероятно, происходит в непосредственной близости от  $LD_{50}$ . Так, например, если нуль означает выживание и единица — гибель, а отклики, полученные в опыте, перечислены в порядке увеличения дозы, тогда такие последовательности, как 0001011111 и 000110111 означают один возврат, а 0001010111 и 00011010011 — два возврата. Другие примеры приведены в приложении В.

## 4 Принцип теста

4.1 Тест разбит на несколько отдельных этапов. На каждом этапе птицам одновременно скормливают одну дозу (мг/кг массы птицы) испытуемого вещества, вводя ее в зоб или преджелудок. В зависимости от этапа опыта отдельные птицы могут получать разные дозы или нескольким птицам скормливают одну и ту же дозу (то есть одна доза на данной стадии испытаний дублируется повторностями). Для тестируемых веществ, для которых высокая токсичность маловероятна, рекомендуется проводить опыт, скормливая предельную дозу нескольким птицам. Если вещество токсично, вместо варианта опыта с предельной дозой рекомендуется применять последовательную схему опыта. Этапы 1 и 2 не требуют повторностей, а на этапах 3 и 4 дозы дублируют повторностями. На этапе 1 диапазон испытываемых доз основывают на оптимально доступной оценке  $LD_{50}$  (например, величине, установленной для грызунов). Дозы для последующих этапов основывают на уровнях смертности, проявившихся на всех предыдущих этапах опыта, и, таким образом, величину  $LD_{50}$  и угол наклона кривой доза-отклик рассчитывают одновременно.

4.2 После скормливания доз птиц наблюдают в течение 14 дней, для того чтобы установить уровень смертности. Иногда может понадобиться расширение срока наблюдений, в зависимости от того, проявляются ли признаки отложенного воздействия. Постепенный опыт проще всего ставить при тестировании веществ, вызывающих гибель в течение нескольких дней. В этом случае нет необходимости ожидания 14 дней до перехода к следующему этапу, хотя наблюдения за всеми птицами нужно продолжать. Смертность, выявленная по истечении небольшого промежутка времени, может быть использована для определения величин доз для испытаний на следующих этапах опыта (обычно можно использовать срок три дня). Птиц, проявляющих очевидные признаки боли или страданий, подвергают эвтаназии.

Данные, полученные в течение первых трех дней этапа опыта, обычно достаточны для того, чтобы установить, восстановятся ли птицы от оказанного воздействия или будет происходить дальнейшее развитие интоксикации и гибель [2]. Расчет рабочих (примерных) оценок измеряемых величин уже на 3-й день этапа опыта позволяет завершить опыт и провести все дозирование на протяжении более короткого времени. Если данные по 3-му дню свидетельствуют, что возможно дальнейшее возрастание смертности птиц, расчет рабочей величины  $LD_{50}$  может быть отложен до тех пор, пока не станет очевидным, что все оставшиеся птицы оправились от воздействия. В некоторых случаях ожидание продлевают до 14 дней, прежде чем переходить к следующему этапу. Окончательный расчет величины  $LD_{50}$  проводят на основе данных, собранных по итогам всех стадий опыта.

4.3 Смертность является главным и основным итогом теста, и на контроле она должна быть пренебрежимо мала. Требуется следить за состоянием здоровья и условиями содержания контрольных птиц, чтобы результаты испытаний не оказались сомнительными. Действия и порядок проведения мониторинга состояния контрольных птиц приведены в 7.3. Птицы, проявляющие в ходе опыта очевидные признаки боли и страданий, подлежат эвтаназии. При проведении экспериментов необходимо соблюдать, насколько возможно, правила гуманного обращения с животными, описанные в Руководстве ОЭСР Документ №19 [10].

## 5 Достоверность теста

Опыт считают недостоверным, если происходит неслучайная смерть одной птицы или погибает более одной птицы по иным обстоятельствам. Если в исходной контрольной группе из пяти особей происходит гибель одной птицы по случайным причинам, к этой группе добавляют еще пять птиц, чтобы их общее число было равно 10. Случайная гибель — это гибель, не связанная с общим состоянием здоровья птиц испытываемой популяции, а являющаяся результатом самостоятельно нанесенного увечья, например сломанная нога или повреждение кожных покровов. Такая гибель противоположна неслучайной (неестественной) смертности контрольных птиц, которая является показателем слабого состояния здоровья популяции птиц, взятой для эксперимента, болезни или плохого ухода за животными.

## 6 Описание теста

### 6.1 Выбор птиц

6.1.1 Предпочтительными являются виды птиц, разводимых и содержащихся в неволе, с низкой фоновой смертностью, не склонных к отрыванию пищи. Наиболее часто используемыми видами, удовлетворяющими этим требованиям, являются северо-американский перепел (*Colinus virginianus*) и японский перепел (*Coturnix japonica* (*Galliform*)). Следует избегать использования диких птиц, заботясь об их благополучии, защите прав животных и контроле заболеваемости.

6.1.2 Иногда может возникнуть необходимость исследований дополнительных видов, чтобы расширить представление о чувствительности к тестируемому веществу. В дополнение к перепелам используют крякву (*Anas platyrhynchos* (*Anseriform*)), сизого голубя (*Columba livia* (*Collumbiform*)), зебровых амадинов (*Poephila guttata* (*Passeriform*)) и волнистых попугаев (*Melopsittacus undulatus* (*Psittaciform*)). Данный список не ограничивает число видов, которые могут быть использованы, но рекомендует некоторые достаточно жизнестойкие и пригодные к лабораторному разведению виды, относящиеся к разным отрядам.

6.1.3 Птицы должны иметь полностью развитое, но не брачное оперение. По возможности предпочтительны дикие фенотипы. Разводимые в неволе птицы должны быть из одного источника и популяции, в истории их разведения по возможности должно присутствовать периодическое неродственное скрещивание для поддержания генетической неоднородности. Если нет возможности использовать дикие фенотипы, птиц следует отбирать из смеси разных фенотипов, чтобы свести к минимуму признаки кровосмешения (инбридинга).

6.1.4 Птицы должны отбираться для опытов по случайному признаку из смешанных групп, не находящихся в периоде размножения, или групп, содержащих птиц одного пола. При обороте птиц по случайному признаку из смешанных групп сводятся к минимуму возможные различия в чувствительности к пестицидам (по острой пероральной токсичности), обусловленные полом птиц [3, 4]. Для некоторых веществ или их классов характерна разная чувствительность, связанная с половой принадлежностью птиц [5]. Частота встречаемости разной степени токсичности веществ для животных разных полов не-

однозначна. Если есть вероятность таких различий в степени токсичности, то опыт должен быть проведен так, чтобы можно было установить величины  $LD_{50}$  для птиц обоих полов.

## 6.2 Содержание птиц и условия теста

6.2.1 Данный тест разработан так, чтобы на начальных стадиях опыта дозировке каждой отдельной дозой подвергалась одна птица. Для того чтобы иметь возможность проследить за признаками воздействия при отрывании пищи птицами, рекомендуется содержать их по отдельности по крайней мере первые три дня опыта. При этом птиц наблюдают индивидуально и фиксируют особенности их поведения. Для стайных видов, таких как зебровые амадины, обязательно клетки размещают так, чтобы птицы могли видеть друг друга и перекликаться, для остальных видов аналогичное размещение желательно. Поскольку в данном опыте предусмотрено содержание птиц по одной, условия их содержания должны быть оптимальными для каждого конкретного вида: минимальное рекомендованное пространство в расчете на одну птицу не должно быть менее 3333 см<sup>2</sup> для голубей, 2000 см<sup>2</sup> для крякв, 1000 см<sup>2</sup> для перепелов, 500 см<sup>2</sup> для волнистых попугаев и зебровых амадинов. Клетки большего размера используют в случаях, рекомендованных соответствующими Руководствами для отдельных стран или областей и/или при необходимости соблюдения правил благополучного содержания животных. Пол клеток должен быть сделан из сетки с отверстиями, достаточно широкими для пропускания фекалий, но не мешающими птицам передвигаться. Необходимым условием содержания голубей, попугаев и амадинов является наличие в клетке жердочек.

6.2.2 Следует контролировать уровень влажности и температуру окружающей среды. Для содержания крякв и перепелов подходит температура 15 °С—27 °С, но флуктуации ее должны быть сведены к минимуму в ходе опыта. Вентиляция, осуществляемая в клетках, должна обеспечивать полный обмен воздуха минимум 10 раз в час. Освещенность для перепелов и крякв должна соответствовать 8 ч света и 16 ч темноты. Для других видов может возникнуть необходимость увеличения периода освещения до 10 ч. Свежая пища и вода должны предоставляться без ограничений (*ad libitum*). Коммерческие корм и витамины могут использоваться, но при условии соответствия их состава пищевым потребностям данного вида птиц. В течение 14 дней до момента скармливания птицам испытуемого вещества и в течение всего периода опыта следует избегать применения лекарственных средств. Корм и вода подлежат периодическому анализу, чтобы исключить их загрязнение, способное повлиять на здоровье птиц.

## 6.3 Подготовка птиц

Птицы должны быть однозначно идентифицированы. Птицы, живущие в клетках, как минимум в течение 14 дней до начала испытаний должны пройти акклиматизацию к условиям содержания и рациону кормления. Поиманные дикие птицы обычно нуждаются в более долгом сроке акклиматизации. Нужно убедиться в том, что птицы здоровы: они не должны использоваться в экспериментах, если на протяжении периода акклиматизации умерло более 5 % птиц, разводимых в неволе (клеточное содержание) и более 10 % отловленных диких птиц. Если диких птиц не удалось акклиматизировать, они должны быть выпущены недалеко от места отлова. Использование диких птиц следует всеми силами избегать, принимая во внимание соображения о благополучии животных и возможное варьирование их возраста, генетических особенностей, состояния здоровья. Поимка, транспортирование и изоляция птиц в клетки вызывают сильный стресс и могут привести к более высокой смертности. Птицы клеточного содержания должны быть примерно одного возраста.

## 6.4 Подготовка и введение доз

6.4.1 Испытуемое вещество должно быть капсулировано или растворено (суспензировано) в подходящем растворителе и затем введено птицам принудительно через зонд. Если оно может быть растворено или суспензировано, рекомендуется при возможности в первую очередь использовать водный раствор (суспензию), затем — масляный раствор или эмульсию (например, в кукурузном масле) и только затем пробовать использовать другие растворители. Токсичность всех используемых растворителей, кроме воды, должна быть известна (определена), также растворитель не должен вызывать отрыгивания. Дозировка для каждой птицы должна соответствовать ее весу, определяемому за несколько часов до опыта.

6.4.2 Тестируемое вещество должно вводиться птице однократно с помощью зонда. Объем дозы должен быть постоянным, соответствовать весу птицы и не превышать 10 мл/кг массы. Птиц не следует кормить в течение 12—15 ч в ночное время непосредственно перед введением доз. Для крупных птиц, таких как норвежская куропатка и японский перепел, рекомендуется голодание в течение ночи. Более

короткий период голодания — 2 ч — приемлем для птиц весом около 50 г и менее. Голодание в течение ночи может повредить состоянию птиц с малой массой тела [11].

6.4.3 Отрыгивание уменьшает проявление токсичности, и такие случаи должны регистрироваться. Добавка нетоксичного пищевого красителя, отличного по цвету от помета (например, FD&C Blue#1, Формула 773389, CAS 57-55-6), позволяет легче диагностировать случаи отрыгивания. Отрыгивание — особенность опытов по оценке острой пероральной токсичности и зависит от способа введения доз или специфики вещества. Частота его может быть уменьшена за счет снижения объемов введения, капсулирования вещества или смены растворителя. Рекомендуется, особенно при использовании в опытах видов, относящихся к воробьиным, провести некоторое предварительное исследование для подбора диапазона доз с целью оценки склонности птиц к отрыгиванию. Если срыгивание остается и представляет собой проблему, может понадобиться рассмотреть другие возможные виды для их использования в опытах. Если единственной возможностью является постановка опыта, несмотря на отрыгивание, точная оценка значения  $LD_{50}$  не будет получена. Единственным выводом может быть то, что величина  $LD_{50}$  будет выше, чем минимальное значение, при котором не наблюдалось отрыгивания и гибели птиц.

## 6.5 Наблюдение за птицами

6.5.1 В течение первых 2 ч после скармливания доз наблюдения за птицами ведут постоянно, регистрируя отрыгивание корма и начало проявления клинических признаков отравления, далее как минимум три раза в день (в течение светового дня), через равные промежутки, — также на предмет контроля признаков отравления, после чего наблюдают еще в течение 14 дней, как минимум один раз в день. Однако продолжительность периода наблюдений не является жестко фиксированной. Наблюдения ведут, пока происходит прогрессирование клинических проявлений отравления и пока не прекращается смертность. Если срок наблюдений был продлен на одном из этапов опыта, то для всех остальных последующих этапов его продлевают аналогично.

6.5.2 Наблюдения включают: случаи отрыгивания, признаки интоксикации и ремиссии, отклонения от нормального поведения, показатели веса, смертность и время гибели.

6.5.3 Случаи гибели, не связанные со скармливанием вещества (например, вследствие физической травмы), не включают в расчет. Если такая смерть происходит среди птиц контрольной группы, к ней добавляют дополнительных птиц (7.3.1).

6.5.4 Птиц взвешивают перед введением вещества, а затем на 3, 7 и 14-й день опыта (и позже, если опыт длится дольше), контролируя изменение массы тела. Потребление пищи должно фиксироваться ежедневно до 3-го дня, затем за периоды 3—7-й день и 7—14-й день после начала опыта. В конце опыта должны быть проведены макрпатологические исследования всех птиц, в том числе выживших, из всех групп наблюдений, включая контрольную, что позволяет установить точные причины гибели птиц, исключить случаи, обусловленные естественными причинами и идентифицировать признаки интоксикации. Если у всех птиц не было зафиксировано признаков клинических проявлений и не происходило гибели, патолого-анатомические исследования не нужны.

6.5.5 Птицы, явно больные и проявляющие признаки страданий, должны умерщвляться [10].

## 7 Процедура теста

### 7.1 Тест предельной дозы

7.1.1 Схема опыта по определению предельной дозы предусматривает скармливание этой дозы одновременно пяти птицам, в то время как контрольным птицам вещество не дают (скармливают placebo). Содержание и распорядок действий, проводимых для контрольных птиц, приведены в 7.3. Затем птиц наблюдают в течение 14 дней. Процедура, которой надо следовать по мере выявления смертности птиц, представлена на рисунке 1. Случаи эвтаназии птиц, предпринимаемой для прекращения их страданий, вызванных токсичностью вещества, следует включать в число случаев смертности, обусловленных обработкой веществом.

7.1.2 Если в течение 14 дней смертности среди птиц не происходит, можно с 95 %-ным уровнем вероятности утверждать, что величина  $LD_{50}$  выше предельной дозы. Опыт завершен. Неудачный тест предельной дозы — тот, при котором нельзя утверждать с 95 %-ной вероятностью, что значение  $LD_{50}$  выше предельной дозы, тогда необходимо переходить к этапам 1 и 2 последовательного опыта.

7.1.3 Если происходит один случай гибели от предельной дозы, а остальные испытываемые птицы не проявляют признаков интоксикации, новые 5 птиц должны быть подвергнуты введению этой дозы,

или же по решению руководителя испытаний или заказчика можно перейти к этапу 2 последовательного опыта. Дополнительное дозирование может быть предпринято, не дожидаясь окончания 14-дневного срока наблюдений. Если предельный тест продлевают и в итоге на 10 птиц по-прежнему фиксируется одна гибель и отсутствие признаков отравления у остальной группы, заключают с 95 %-ным уровнем достоверности, что значение  $LD_{50}$  находится выше, чем тестируемая предельная доза.

7.1.4 Если происходит одна гибель и отсутствуют признаки отравления у остальных птиц (из 5), в случае гибели 2—4 птиц из 5, а также в случае гибели 2 и более птиц из 10 переходят к этапу 2 последовательного опыта, схема которого дана на рисунке 2.

7.1.5 Если все птицы погибли (включая тех, которые были подвергнуты эвтаназии), переходят к последовательному опыту, начиная с этапа 1 (рисунок 2). Дополнительное дозирование может быть начато до окончания 14-дневного срока наблюдений.

7.1.6 Для перехода к этапу 2 последовательного опыта необходимо представление о примерной оценке величины  $LD_{50}$ , чтобы установить нужные для этого этапа уровни дозирования. Используя примерные величины из таблицы 1, полученные в опыте, когда предельная доза была 2000 мг/кг массы птицы, нижние и верхние величины дозирования можно рассчитать по способу, описанному в 7.2.2.2. В методике расчета рабочей величины  $LD_{50}$  используют данные неудачного варианта опыта с предельной дозой при любой ее величине (см. приложение С).

Таблица 1 — Рабочая величина  $LD_{50}$ , необходимая для этапа 2 последовательного опыта и определяемая на основе смертности, выявленной в опыте с предельной дозой 2000 мг/кг массы птицы

Смертность, %	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Рабочая величина $LD_{50}$	3606	2944	2541	2244	2000	1782	1574	1358	1109

7.1.7 Нужно отметить, что в некоторых случаях величину  $LD_{50}$  нельзя определить, не проводя опыт с дозировками выше предельной дозы. Поскольку есть ограничения на использование очень высоких количеств (концентраций) испытуемого вещества, значение  $LD_{50}$  для слаботоксичных веществ не всегда можно найти.

## 7.2 Простой $LD_{50}$ -тест и градиентный $LD_{50}$ -тест

### 7.2.1 Общие требования

7.2.1.1 Особенности определения доз для каждой стадии последовательного опыта приведены ниже. Детальная схема приведена на рисунке 2. Примерный порядок опыта, состоящий из 4 этапов, каждый из которых продолжается 14 дней, приведен на рисунке 3. Процедура и указания для содержания птиц контрольной группы описаны в 7.3.

7.2.1.2 Первичная оценка  $LD_{50}$  может быть основана на известных представлениях о токсичности вещества (например, данных для млекопитающих) или токсичности других веществ данного химического класса. Для каждой стадии опыта значения минимальной и максимальной доз и шаг (*dose, hdose, step*) должны рассчитываться заново, чтобы определить последовательность дозирования, используемых на каждой стадии.

7.2.1.3 Принцип максимального правдоподобия (MLE) — методика, которая позволяет определить параметры модели, обеспечивающей наиболее точное сходство с имеющимися данными. Этими параметрами в данном случае являются угол наклона и пересечение с осью координат пробит-функции, которые используют для расчета  $LD_{50}$ . Чтобы использовать MLE, нужно наблюдать в опыте как минимум два случая возврата и два случая частичной смертности (7.2.1.4). Если эти условия соблюдаются, последовательный опыт позволяет с помощью MLE найти  $LD_{50}$  и угол наклона функции по данным, полученным на этапах 1 и 2 (при наличии в опыте как минимум двух возвратов), и по данным, полученным на более поздних этапах (при наличии как минимум двух случаев частичной смертности и двух возвратов).

7.2.1.4 Определение понятий возврата и частичной смертности являются существенным для корректного определения условий следующего этапа опыта. Возвраты (случаи, когда процент смертности при последующей дозе ниже, чем при предыдущей) и частичная смертность (ситуации, когда среди выборки птиц, подвергнутых воздействию одной данной дозы, смертность колеблется от 0 % до 100 %) используются как критерии, определяющие необходимость проведения следующего этапа опыта или возможность его остановки. Рекомендуется сначала учитывать случаи частичной смертности, а затем, при необходимости, число возвратов. Пример гипотетического опыта с исходами в виде частичной смертности и случаями возврата приведен в приложении А.

## 7.2.2 Подробное описание последовательного теста

Обзор общих инструкций по завершению теста приведен в 1.5 и на рисунках 1 и 2. Описание схемы последовательного теста дано в приложении А.

### 7.2.2.1 Этап 1.

4 дозы, равномерно распределенные в логарифмическом масштабе относительно исходной оценки значения  $LD_{50}$

Расчет минимальной и максимальной доз и интервала шага ( $ldose$ ,  $hdose$ ,  $step$ ) на этапе 1 проводится следующим образом:

(1) Для расчета минимальной  $ldose$  и максимальной  $hdose$  используют приведенные ниже уравнения, где первично используемое (исходное) значение  $LD_{50}$  базируется на значении, полученном для грызунов, в опытах с другими видами или взято из таблицы 1 (из итогов неудачного опыта с предельной дозой; значения  $LD_{50}$  для опытов с предельной дозой, иной, чем 2000 мг/кг массы птицы, приведены в приложении С):

$$ldose = \text{доза } 1 = 0,1414 \times LD_{50} (\text{исх}),$$

$$hdose = \text{доза } 4 = 7,071 \times LD_{50} (\text{исх}).$$

(2) Если расчетная величина  $hdose$  получается больше 3330, ее устанавливают на этом уровне (или может быть взята меньшая величина при наличии физических ограничений), а низшую дозу  $ldose$  пересчитывают так:  $ldose = hdose/50$ .

(3) Шаг рассчитывают следующим образом:  $step = 50^{1/3} = 3,679$ .

(4) Расчет 2-й и 3-й доз:

$$\text{доза } 2 = ldose \times step,$$

$$\text{доза } 3 = \text{доза } 2 \times step = ldose \times step \times step.$$

(5) Каждую дозу (доза 1, доза 2, доза 3, доза 4) скормливают одной из четырех птиц.

(6) Птиц наблюдают в течение определенного времени (обычно 3 дня), отмечая, живы они или погибли. Рассчитывают «рабочее значение»  $LD_{50}$ , которое определяют как среднегеометрическое от доз, представляющих собой переход от гибели до выживания (см. таблицу 2). Полученное рабочее значение  $LD_{50}$  будет использовано для установления дозировок для этапа 2 опыта.

Таблица 2 — Расчет рабочего значения  $LD_{50}$  из четырех доз, использованных на 1-м этапе<sup>а, б</sup>

Доза 1	Доза 2	Доза 3	Доза 4	Рабочее значение $LD_{50}$ по данным этапа 1
О	О	О	О	$(\text{доза } 4 \times \text{доза } 5)^{1/2}$
О	О	О	Х	$(\text{доза } 3 \times \text{доза } 4)^{1/2}$
О	О	Х	О	$(\text{доза } 2 \times \text{доза } 3 \times \text{доза } 4 \times \text{доза } 5)^{1/4} = (\text{доза } 3 \times \text{доза } 4)^{1/2}$
О	Х	О	О	$(\text{доза } 1 \times \text{доза } 2 \times \text{доза } 4 \times \text{доза } 5)^{1/4} = \text{доза } 3$
Х	О	О	О	$(\text{доза } 0 \times \text{доза } 1 \times \text{доза } 4 \times \text{доза } 5)^{1/4} = (\text{доза } 2 \times \text{доза } 3)^{1/2}$
О	О	Х	Х	$(\text{доза } 2 \times \text{доза } 3)^{1/2}$
О	Х	Х	О	$(\text{доза } 1 \times \text{доза } 2 \times \text{доза } 4 \times \text{доза } 5)^{1/4} = \text{доза } 3$
Х	Х	О	О	$(\text{доза } 0 \times \text{доза } 1 \times \text{доза } 4 \times \text{доза } 5)^{1/4} = (\text{доза } 2 \times \text{доза } 3)^{1/2}$
О	Х	О	Х	$(\text{доза } 1 \times \text{доза } 2 \times \text{доза } 3 \times \text{доза } 4)^{1/4} = (\text{доза } 2 \times \text{доза } 3)^{1/2}$
Х	О	Х	О	$(\text{доза } 0 \times \text{доза } 1 \times \text{доза } 2 \times \text{доза } 3 \times \text{доза } 4 \times \text{доза } 5)^{1/6} = (\text{доза } 2 \times \text{доза } 3)^{1/2}$
Х	О	О	Х	$(\text{доза } 0 \times \text{доза } 1 \times \text{доза } 3 \times \text{доза } 4)^{1/4} = \text{доза } 2$
О	Х	Х	Х	$(\text{доза } 1 \times \text{доза } 2)^{1/2}$
Х	О	Х	Х	$(\text{доза } 0 \times \text{доза } 1 \times \text{доза } 2 \times \text{доза } 3)^{1/4} = (\text{доза } 1 \times \text{доза } 2)^{1/2}$
Х	Х	О	Х	$(\text{доза } 0 \times \text{доза } 1 \times \text{доза } 3 \times \text{доза } 4)^{1/4} = \text{доза } 2$
Х	Х	Х	О	$(\text{доза } 0 \times \text{доза } 1 \times \text{доза } 4 \times \text{доза } 5)^{1/4} = (\text{доза } 2 \times \text{доза } 3)^{1/2}$
Х	Х	Х	Х	$(\text{доза } 0 \times \text{доза } 1)^{1/2}$

<sup>а</sup> Выживание обозначается как О, гибель — Х.

<sup>б</sup> Хотя в опыте тестируют только четыре дозы (доза 1 — доза 4), расчетные величины дозы 0 и дозы 5 в таблице приведены. Их величины соответствуют значениям, отличающимся на величину «шага» от низшей и высшей используемых доз, доза 0 = доза 1/step и доза 5 = доза 4 × step. Доза 0 нужна при расчетах рабочей величины  $LD_{50}$ , если смертность обнаруживают уже при самой низкой тестируемой дозе, а доза 5 требуется, если при наивысшей использованной дозе фиксируется выживание птиц в опыте.

(7) Наблюдения за птицами продолжают на протяжении оставшихся 11 дней (всего 14 дней).

(8) Если по итогам трех дней ясно, что смертность птиц может продолжаться, расчет  $LD_{50}$  может быть отложен до момента, пока окончательно не выяснится число выживших птиц. В некоторых случаях ожидание может продолжаться все 14 дней до перехода к следующему этапу. Если на этапе 1 опыта период наблюдений для определения рабочего значения  $LD_{50}$  продлевается, он так же продлевается и для всех последующих этапов. Если есть признаки отложенных эффектов после 14 дней, то продолжительность этапа 1 может продлеваться и на более длительный период.

#### 7.2.2.2 Этап 2

10 доз, равномерно распределенных в логарифмическом масштабе относительно рабочего значения  $LD_{50}$ , полученного по итогам этапа 1, или из опыта с предельной дозой, сопровождавшегося частичной смертностью.

Расчет величин  $ldose$ ,  $hdose$  и  $step$  для этапа 2 проводят таким образом:

(1) Рассчитывают минимальную и максимальную дозы, используя приведенные ниже уравнения, в которых рабочее значение  $LD_{50}$  основано на результатах этапа 1 последовательного опыта, или на значениях из таблицы 1, полученных в неудавшемся опыте с предельной дозой (величины для опытов с предельной дозой, отличающейся от 2000 мг/кг, даны в приложении В), или на обоих видах этих данных:

$$ldose = \text{доза } 1 = 0,3425 \times LD_{50} \text{ (рабочая)},$$

$$hdose = \text{доза } 10 = 2,919 \times LD_{50} \text{ (рабочая)}.$$

(2) Если  $hdose$  оказывается выше 3330, ее устанавливают на этом уровне (может быть снижена при наличии физических ограничений), а минимальную дозу пересчитывают:

$$ldose = hdose/8,5.$$

(3) Шаг рассчитывают следующим образом:  $step = (hdose/ldose)^{1/9}$ .

(4) Рассчитывают 8 промежуточных доз:  $доза_i = ldose \times step^{(i-1)}$ , где  $i = 2-9$ .

(5) Каждой из 10 птиц скормливают одну из рассчитанных доз.

(6) Если проводят обычный  $LD_{50}$ -тест, птиц наблюдают в течение 14 дней. Значение  $LD_{50}$  рассчитывают на основе пробит-модели, используя результаты этапов 1 и 2 и теста предельной дозы (при наличии).

(7) Если проводится градиентный  $LD_{50}$ -тест, птиц наблюдают в течение определенного срока (обычно три дня; дольше, если более длительным был период наблюдений на предыдущей стадии или если имеет место отложенная смертность), фиксируя выживание и гибель. Считают количество «возвратов» (т. е. случаев, когда процент смертности при некоторой данной дозе ниже, чем при предыдущей, более низкой, примеры см. в приложении В); рассчитывают пробит-модель по итогам общей смертности, выявленной в опыте с предельной дозой (если они есть), данным этапов 1 и 2 данного опыта, определяют рабочее значение  $LD_{50}$  и, по возможности, угол наклона. Если наблюдаются два и более возвратов, переходят к этапу 3а опыта, в противном случае — к этапу 3б.

(8) Продолжают наблюдение за птицами в течение оставшихся 11 дней (всего — 14 дней).

(9) Если по итогам трех дней понятно, что смертность птиц может продолжаться, расчет  $LD_{50}$  может быть отложен до момента, пока окончательно не будет известно число выживших птиц. В некоторых случаях ожидание может продолжаться все 14 дней, прежде чем можно будет переходить к следующему этапу. Если на этапе 1 опыта период наблюдений продлевается для определения рабочего значения  $LD_{50}$ , он так же продлевается и для всех последующих этапов. Если есть признаки отложенных эффектов после 14 дней, продолжительность этапа 1 может продлеваться и на более длительный период.

7.2.2.3 Этап 3а (два и более возвратов, если совместно использованы данные опыта с предельной дозой, этапов 1 и 2 последовательного опыта).

Две дозы равномерно распределяют по шкале в логарифмическом масштабе вокруг рабочего значения  $LD_{50}$ , найденного по итогам опыта с предельной дозой (при наличии), этапов 1 и 2 последовательного опыта.

Расчет величин  $ldose$ ,  $hdose$  и  $step$  для этапа 3 проводят таким образом:

(1) Если рассчитанное ранее рабочее значение угла наклона больше 15 или меньше 1, используют значения 15 или 1 соответственно и пересчитывают значения  $ldose$  и  $hdose$ . Если значение угла наклона не было получено, для расчетов  $ldose$  и  $hdose$  используют значение, равное 5.

(2) Рассчитывают низшую и высшую дозы по нижеследующим уравнениям, где рабочие значения  $LD_{50}$  и угла наклона рассчитаны исходя из доступных к этому моменту данных (предельный тест, этапы 1, 2):

$$ldose = 10^{(-1,036/\text{рабочий наклон})} \times LD_{50} \text{ (рабочее)},$$

$$hdose = 10^{(1,036/\text{рабочий наклон})} \times LD_{50} \text{ (рабочее)}.$$

(3) Если  $hdose$  выше 3330, ее устанавливают на уровне этого значения (может быть снижено при наличии физических ограничений) и пересчитывают низшую дозу:  $ldose = hdose/10^{(2,072/\text{наклон})}$ .

(4) Минимальную дозу скормливают пяти птицам и максимальную — также пяти птицам, всего используется 10 птиц.

(5) Птиц наблюдают 14 дней, отмечая выживание и смертность. Рассчитывают пробит-модель, основываясь на комбинированных результатах смертности, полученных в опыте с предельной дозой, на этапах 1, 2 и 3а последовательного опыта, после чего определяют окончательную величину  $LD_{50}$  и угол наклона. Опыт считается завершенным.

(6) Если не удается подобрать пробит-модель, это фиксируют, а значение  $LD_{50}$  определяют как среднегеометрическое от доз, находящихся на границах диапазона 50 %-ной смертности. Также для определения  $LD_{50}$  допускается применять другие способы интерполяции или метод скользящего среднего.

7.2.2.4 Этап 3b (менее 2 возвратов при одновременном использовании данных опыта с предельной дозой, этапов 1 и 2)

Пять доз равномерно распределяют в логарифмическом масштабе относительно величины  $LD_{50}$ , рассчитанной по результатам опытов с предельной дозой (при наличии) этапов 1 и 2.

Расчет величин  $ldose$ ,  $hdose$  и  $step$  для 3b этапа проводят следующим образом:

(1) Рассчитывают минимальную и максимальную дозу по уравнениям, приведенным ниже, где рабочее значение  $LD_{50}$  основано на результатах, выявленных к данному моменту (предельный тест, этап 1 и/или этап 2):

$$ldose = \text{доза } 1 = 0,6205 \times LD_{50} \text{ (рабочее)},$$

$$hdose = \text{доза } 5 = 1,6113 \times LD_{50} \text{ (рабочее)}.$$

(2) Если максимальная доза при расчете оказывается выше 3330, ее устанавливают на этом уровне (может быть снижена при наличии физических ограничений) и пересчитывают минимальную дозу:  $ldose = hdose/2,6$ .

(3) Рассчитывают шаг:  $step = (hdose/ldose)^{1/4}$ .

(4) Рассчитывают три промежуточные дозы:  $\text{доза}_i = ldose \times step^{(i-1)}$ , где  $i = 2-4$ .

(5) Каждая из пяти доз дается двум птицам, всего в опыте используют 10 птиц.

(6) Птиц наблюдают в течение определенного периода (обычно три дня; больше, если более длительным был период наблюдений на предыдущей стадии или если происходит отложенная смертность), фиксируя выживание и гибель. Рассчитывают пробит-модель по итогам общей смертности, выявленной в опыте с предельной дозой (если они есть), данным этапов 1, 2 и 3b данного опыта, определяют рабочее значение  $LD_{50}$  и угол наклона.

(7) Если в ходе опытов зафиксировано, по меньшей мере, два возврата или два варианта, когда наблюдалась частичная смертность, и рассчитано рабочее значение угла наклона, проведение этапа 4 не требуется. Наблюдения за птицами продолжают до конца 14-дневного периода, строят пробит-модель по объединенным данным опыта с предельной дозой (при наличии), этапов 1, 2 и 3b, рассчитывают окончательное значение  $LD_{50}$  и угол наклона. Опыт завершен.

(8) Если не соблюдаются условия, сформулированные в предыдущем пункте, переходят к этапу 4.

(9) Продолжают наблюдение за птицами в течение еще 11 дней (всего 14 дней).

(10) Если по результатам 3-го дня понятно, что смертность на этом этапе может продолжиться, расчет рабочего значения  $LD_{50}$  может быть отложен до момента, пока окончательно не выяснится, сколько птиц выжило. Иногда необходимо ждать до 14-го дня, прежде чем переходить к следующему этапу. Если период наблюдений, требовавшийся для расчета рабочей величины  $LD_{50}$  на этом этапе, продлен, то для последующих этапов он должен быть продлен соответственно. При наличии признаков отложенных эффектов продолжительность наблюдений может быть более 14 дней.

7.2.2.5 Этап 4

Пять доз, равномерно распределенных в логарифмическом масштабе вокруг рабочего значения величины  $LD_{50}$ , полученного из опыта с предельной дозой (при наличии) и стадий 1, 2 и 3b. Расчет величин  $ldose$ ,  $hdose$  и  $step$  для этапа 4 проводят следующим образом:

(1) Рассчитывают минимальную и максимальную дозу по следующим уравнениям, в которых рабочее значение  $LD_{50}$  основано на всех доступных к этому моменту данных (опыт с предельной дозой, этапы 1, 2 и/или 3b):

$$ldose = \text{доза } 1 = 0,6205 \times LD_{50} \text{ (рабочая)},$$

$$hdose = \text{доза } 5 = 1,6113 \times LD_{50} \text{ (рабочая)}.$$

(2) Если максимальная доза  $hdose$  оказывается выше 3330, ее устанавливают на этом уровне (может быть уменьшена при наличии физических ограничений) и пересчитывают минимальную дозу:  $ldose = hdose/2,6$ .

(3) Рассчитывают шаг:  $step = (hdose/ldose)^{1/4}$ .

(4) Рассчитывают три промежуточные дозы:  $доза_i = ldose \times step^{(i-1)}$ , где  $i = 2-4$ .

(5) Каждую из пяти доз скармливают двум птицам, всего 10 птиц.

(6) Наблюдают птиц 14 дней, отмечая гибель и выживание. Подбирают пробит-модель для объединенных данных, полученных из опыта с предельной дозой (при наличии) этапов 1, 2, 3b и 4 для расчета окончательного значения величины  $LD_{50}$  и наклона. Опыт завершен.

(7) Если к концу этапа 4 не удастся получить результат, используя принцип максимального правдоподобия, это отмечают, а величину  $LD_{50}$  определяют как среднегеометрическое от доз, ограничивающих диапазон, в котором наблюдается 50 %-ная смертность. Также можно использовать в расчетах другие способы интерполяции и метод скользящего среднего.



Рисунок 3 — Пример плана-графика последовательной схемы испытания с четырьмя этапами (стадии 1, 2, 3b и 4) по 14 дней, рисунок не включает контрольную группу птиц

### 7.3 Птицы контрольной группы

7.3.1 В тесте используют пять птиц из одного выводка. Птицы контрольной группы получают плацебо в том же носителе (или капсуле), который используют для тестируемого вещества, и содержатся в тех же условиях, что и птицы опытных вариантов. Птиц контрольной группы взвешивают до начала испытания, а также на 3, 7 и 14-й день. Корм с плацебо вводят в рацион в тот же день, что и корм с первой дозой тестируемого вещества (либо одновременно с началом теста на предельную дозу, если он выполняется; либо на начальных стадиях (стадиях 1 или 2) последовательной схемы испытания).

7.3.2 Возможные обстоятельства, при которых в ходе опыта в контрольную группу дополнительно вводят пять птиц:

- если для нового этапа опыта брать птиц из другого выводка, в отличие от первого этапа, тогда таких же птиц (из второго выводка) нужно ввести в состав контрольной группы в тот же день, когда их ввели в опытный вариант;

- если на разных этапах испытания подопытные птицы получают разные по объему дозировки, контрольные птицы должны получать аналогичные порции корма с плацебо соответственно каждому

такому этапу. Такая ситуация может произойти в случае, когда необходимо увеличить максимальную тестируемую дозу или когда для получения необходимого раствора/суспензии требуется больший объем растворителя;

- если выполняется градиентный LD<sub>50</sub>-тест и периоды между стадиями длительные или существенно различные (например, от 3 до 10 дней), контрольные птицы должны получать корм с плацебо и вводиться в испытание в середине серии последовательных испытаний (например, в начале этапа 2 или этапа 3).

7.3.3 Дополнительные птицы для вариантов контролей также могут понадобиться в зависимости от результатов наблюдений за исходной контрольной группой (раздел 5). Для этой цели необходимо иметь часть птиц в резерве.

## 8 Данные и отчет о проведении теста

### 8.1 Данные

Должны быть представлены данные по каждой птице и их обобщение в табличной форме, с указанием дозы, количества птиц в опыте, признаков интоксикации, смертности, времени смерти отдельных птиц, времени проявления и прекращения клинических признаков воздействия вещества, веса измеренного непосредственно перед дозированием, на 3, 7, 14-й день и по окончании опыта, если период наблюдения был продлен более чем на 14 дней в связи с отложенной смертностью, потреблением корма и при обнаружении макрпатологических изменений.

### 8.2 Расчет LD<sub>50</sub>, угла наклона кривой и доверительных интервалов

8.2.1 Методы расчета LD<sub>50</sub> (полулетальной дозы) в последовательных опытах аналогичны тем, которые применяются для других тестов доза-отклик. Некоторые особенности этих последовательных схем основаны на предположении, что основная форма кривой доза-отклик аппроксимируется пробит-моделью, так что для оценки LD<sub>50</sub> возможно использование модели пробит-регрессии (с логарифмом дозы в качестве независимой переменной). Для пробит-модели в качестве MLE для Log(LD<sub>50</sub>) берется  $-a/b$ , где  $a$  — точка пересечения и  $b$  — наклон. Если пробит-модель не позволяет получить адекватно соответствия опытным данным, также можно использовать другие модели, объединив для анализа данные о смертности от всех этапов исследования.

8.2.2 Стандартные методы максимального правдоподобия, применяемые для моделирования данных, могут быть использованы только при наличии среди результатов испытаний двух доз, вызвавших частичную смертность, или двух возвратов. Эти условия заложены в последовательной схеме теста и не соблюдаются только в редких случаях. Если оценки по принципу максимального правдоподобия не могут быть получены, это указывает в отчете и оценивают LD<sub>50</sub> как среднее геометрическое доз по обе стороны от области, в которой происходит 50 %-ная смертность. Альтернативно для оценки LD<sub>50</sub> можно применить другие способы интерполяции и метод скользящего среднего.

8.2.3 Доверительные интервалы для LD<sub>50</sub> могут быть получены с использованием теоремы Феллера [6], методов отношения правдоподобия [7], [8] или биномиальными методами [9]. Многие стандартные статистические пакеты имеют встроенные опции для оценки LD<sub>50</sub> и доверительных интервалов (например, SAS®, LogXact®).

8.2.4 Следует учитывать, что зачастую можно вычислить наклон и доверительные интервалы для LD<sub>50</sub> из результатов простого LD<sub>50</sub> теста. Тем не менее из-за небольшого количества птиц и отсутствия повторностей для каждой отдельной дозы, такие оценки могут быть ненадежными. Таким образом, наклон кривой доза-отклик и доверительные интервалы для LD<sub>50</sub> должны быть представлены только для градиентного LD<sub>50</sub>-теста. Некоторые критерии качества подгонки регрессионной модели (например, критерий согласия Пирсона, отношения правдоподобия хи-квадрат) следует представлять для каждого теста доза-отклик. Предоставление показателей качества модели (критериев согласия) для простого LD<sub>50</sub>-теста необязательно.

8.2.5 Руководство Microsoft® Excel под названием SEquential DEsign Calculator (SEDEC) доступно на сайте ОЭСР и может помочь в выборе дозы и при анализе результатов исследований, проведенных в соответствии с OECD TG223. Для установки SEDEC на компьютере пользователя требуется Microsoft® Excel для Windows 2000 или более поздней версии.

### 8.3 Отчет

Отчет должен содержать следующий минимум информации, подтверждающей соответствие настоящему стандарту, и результаты теста вещества:

Тестируемое вещество:

- идентификация;
- номер пакета и партии;
- чистота;
- стабильность при комнатной температуре;
- летучесть.

Методы и системы испытания:

- тип испытания;
- тестируемые организмы, источник, штамм, возраст, вес, здоровье;
- описание метода испытания.

Проведение теста:

- тестируемая группа и схема эксперимента (число обработок и повторностей, индивидуальное или групповое содержание);
- акклиматизация и назначение обработок (продолжительность, интервалы (рандомизация));
- метод дозирования (затравка/капсула, носитель/растворитель, объем/птица, в % от веса);
- условия содержания птиц (тип, размер, материалы клеток, напольные покрытия, температура, влажность, световой день, интенсивность света);
- корм и вода (доступность, описание, источник, состав, калорийность, результаты анализа загрязнений);
- частота, продолжительность и метод наблюдений (здоровье/смертность, масса тела, потребление пищи);
- описание статистических методов.

Результаты теста:

- смертность (время до смерти, клинические симптомы, расчет  $LD_{50}$ , крутизны (наклона) графика доза-отклик, доверительные интервалы, при необходимости);
- начало проявления и прекращение клинических признаков (в минутах);
- общая патологическая (макропатологическая) экспертиза;
- индивидуальные данные веса тела;
- данные о потреблении корма.

**Приложение А**  
**(рекомендуемое)**

**Общая характеристика, обоснование и статистические основы последовательной схемы эксперимента**

**Основы статистики**

Теоретической основой распределения величин толерантности является то, что отдельная птица погибнет, если получит дозу выше некоторого определенного значения, но выживет, если доза равна или меньше этого значения. Это конкретное значение называется толерантностью (пределом устойчивости). Предполагается, что оно должно быть установлено для отдельной птицы, но между особями варьируется. Таким образом, если есть популяция птиц, можно говорить о статистическом распределении величин толерантностей или толерантном распределении.

Для оценки распределения толерантности по выборочной совокупности птиц подбирают статистическую модель. Если предположить, что проявления толерантности отвечают нормальному распределению, то оно вписывается в пробит-модель, которая имеет вид:

$$\text{Probit}(p) = \alpha + \beta \cdot \log(d), \quad (1)$$

где:  $p$  — вероятность того, что толерантность к данному воздействию отдельной птицы меньше дозы  $d$ , т. е. вероятность того, что птица, получившая дозу  $d$ , выживет;  $\alpha$  и  $\beta$  — параметры, представляющие отрезок, отсекаемый на оси, и наклон линейной зависимости между пробит ( $p$ ) и  $\log(d)$ .

Пробит-модель пригодна для описания экспериментальных данных и позволяет получить оценки величин параметров  $\alpha$  и  $\beta$ , которыми являются  $a$  и  $b$  соответственно. Оценку среднего для распределения толерантности (оценку средней величины толерантности) в популяции птиц (называемого  $LD_{50}$ ) можно определить по уравнению:

$$\text{оценка } [\log(LD_{50})] = -a/b. \quad (2)$$

Дисперсию толерантности вычисляют по формуле

$$\text{дисперсия} = 1/b. \quad (3)$$

Когда распределение толерантности установлено (т. е. получены значения  $\alpha$  и  $\beta$ ), могут быть вычислены перцентили (уровни доз, соответствующие конкретным значениям  $p$ ).

Рекомендации по методам оценки  $LD_{50}$ , наклона и доверительных интервалов для различных экспериментальных результатов даны в (2). Наклон оценивают, если есть по крайней мере два случая частичной смертности и/или возвратов.

Схема данного теста состоит из нескольких этапов, на каждом из которых определенное число птиц дозируют одновременно и наблюдают в течение периода времени. Преимуществом такой схемы является то, что информацию, собранную на ранних стадиях, в частности рабочие оценки  $LD_{50}$  и наклон кривой доза-отклик, используют для разработки схемы следующего этапа, в частности для определения доз. Общая схема теста является гибкой в отношении количества этапов и доз на каждом этапе, и количества птиц, подвергаемых воздействию одной дозы. Описанная в стандарте схема разработана с помощью компьютерного моделирования и включает четырех птиц на первой стадии и десять — на последующих, тогда как количество доз и количество птиц на дозу варьируются между этапами.

В начале теста предполагается, что доступна некоторая исходная (первичная) оценка  $LD_{50}$ . На практике эта оценка может быть получена с использованием сведений по химии и токсичности аналогичных действующих веществ или из результатов испытаний на других видах птиц или млекопитающих. Кроме того, первичная оценка может быть получена из опытов с предельной дозой. Первые три этапа последовательного опыта значительно отличаются друг от друга. Первый этап является «разведочным», разработанным для подтверждения и уточнения начального приближения к  $LD_{50}$ . Второй предназначен для более точного определения  $LD_{50}$ . Третий этап и любые последующие предназначены для оценки доверительного интервала и наклона кривой доза-отклик или для дальнейшего снижения неопределенности в оценке  $LD_{50}$ .

Поскольку дозирование происходит ступенчато, рабочие оценки  $LD_{50}$  и наклон постоянно пересчитываются. Каждый раз при выполнении перерасчетов количество групп с частичной смертностью или число возвратов в смертности может измениться. Рабочие оценки могут быть получены через 3, 6 и 9 дней после начала испытания, но на каждом этапе наблюдения продолжают до 14-го дня. По завершении исследования, окончательные оценки

$LD_{50}$  и наклона (а также доверительные интервалы, в случае необходимости) определяют из общего набора данных (т. е. со всех этапов) всех 14-дневных периодов.

На этапе 1 четыре дозы равномерно распределяют по логарифмической шкале вокруг исходной (первичной) оценки  $LD_{50}$ . При компьютерном моделировании обнаружено, что использование четырех доз и очень широкого отношения высокой дозы к низкой дает адекватную рабочую оценку величины  $LD_{50}$  и позволяет сохранить птиц для более поздних стадий, где они более полезны для определения наклона. Рабочая оценка  $LD_{50}$ , рассчитанная как среднее геометрическое переходных доз, имеет несколько преимуществ. Во-первых, она может обеспечить разумную оценку при малом количестве информации, а во-вторых, она может быть адаптирована для получения рабочей оценки  $LD_{50}$  даже при наличии смертности при низкой дозе или выживания при максимальной дозе.

Целью этапа 2 является уточнение оценки  $LD_{50}$  и получение первичной оценки наклона. Чтобы на этой стадии получить конечную оценку  $LD_{50}$  для простого  $LD_{50}$ -теста и рабочую оценку для градиентного  $LD_{50}$ -теста, крайние дозы располагают в точках, соответствующих 1 % и 99 % погибших особей, рассматривая распределение толерантности как нормальное со средним, равным  $LD_{50}$ , стандартным отклонением, равным  $1/\text{наклон}$ , и приняв угол наклона равным 5. Обоснованием для использования значения 5 для наклона является обзор экологической базы данных Агентства по охране окружающей среды (Environmental Protection Agency) ECOTOX [<http://www.epa.gov/ecotox/index.cfm>], который свидетельствует, что по материалам испытаний пестицидов, представленных в Агентство за всю историю, модальное значение наклона, полученных в испытаниях острой токсичности для птиц, равно именно пяти.

Целью этапов 3а и 3б являются уточнение и улучшение рабочих оценок  $LD_{50}$  и наклона, полученных на этапе 2, по которым уже возможно получить величины доверительных интервалов. Этап 3а предпочтителен в случае, когда наблюдается больше одного возврата, показывающих, что получена достоверная информация о  $LD_{50}$  и наклоне. Этап 3б является предпочтительным, если имеется менее двух возвратов, что свидетельствует о том, что информации о  $LD_{50}$  и наклоне недостаточно.

На этапе 3а предельные значения устанавливают на основе рассчитанного значения наклона, поскольку значения, полученные на основе принципа максимального правдоподобия, с использованием небольшого количества наблюдений могут дать крайние (возможно, неточные) оценки величины наклона. Половине из десяти птиц дают более низкие дозы, соответствующие 15 % смертности, а половине — высокие, соответствующие 85 % смертности. Обоснование для выбора доз на вариантах 15-го и 85-го перцентилей следует из статистической концепции под названием D-оптимальность [8]. Эта форма оптимальности дает наилучшие оценки одновременно  $LD_{50}$  и наклону (в том смысле, что ширина доверительных интервалов для  $LD_{50}$  и наклон одновременно минимизированы).

В расчетах на этапе 3б наклон принимают равным пяти и предельные дозы соответствуют 15 % и 85 % смертности. Чтобы уточнить стабильность оценки  $LD_{50}$ , полученной на данном этапе, для подгонки пробит-модели дополнительно подсчитывают количество возвратов и случаев частичной гибели. Если число возвратов равно двум или более и/или количество случаев частичных смертей равно двум или более, то исследование можно прекратить.

Этап 4 аналогичен этапу 3б и проводится с целью оценки наклона, если оценка на этапе 3б нестабильна или доверительные интервалы очень широки. После этапа 4 испытание не продолжают.

**Приложение В**  
**(рекомендуемое)**

**Определение числа частичных смертей и возвратов**

Возвраты (случаи, когда процент смертности при данной дозе выше, чем процент смертности на следующей более высокой дозе) и частичная гибель (когда нескольким птицам введена одинаковая доза и смертность при этой дозе варьируется от 0 % до 100 %) используются как критерии либо для перехода к следующему этапу, либо для прекращения (завершения) испытания. Рекомендуется сначала подсчитывать число случаев частичной гибели, а затем при необходимости подсчитывать число возвратов. Возвраты, следующие за частичной гибелью, учитываются и как возврат, и как частичная гибель.

Примеры результатов гипотетического опыта с выявленными случаями частичной гибели и возврата приведены ниже. В этих примерах дозы увеличиваются слева направо, случаи частичной гибели отмечены звездочкой (\*), возвраты выделены полужирным шрифтом в затемненных ячейках.

**Пример 1 — Этап 2** ( $n_{птиц} = n_{стадия 1} + n_{стадия 2} = 4 + 10$ , число отдельных доз = 14), 0 случаев частичной гибели, 2 возврата, переходим к этапу 3а.

Число смертей	0	0	0	0	0	1	<b>0</b>	1	1	<b>0</b>	1	1	1	1
Число испытуемых особей	1	1	1	1	1	1	<b>1</b>	1	1	<b>1</b>	1	1	1	1
Процент (%) смертности	0	0	0	0	0	100	<b>0</b>	100	100	<b>0</b>	100	100	100	100

**Пример 2 — Этап 2** ( $n_{птиц} = n_{стадия 1} + n_{стадия 2} = 4 + 10$ , число отдельных доз = 12, самая низкая и высокая дозы для этапов 1 и 2 были одинаковы, минимальный и максимальный пределы (66,6 и 3330 мг/кг массы тела), 0 случаев частичной гибели, 1 возврат, переходим к этапу 3б.

Кол-во смертей	0	0	0	0	0	1	<b>0</b>	1	1	1	1	1	2
Кол-во испытуемых особей	2	1	1	1	1	1	<b>1</b>	1	1	1	1	1	2
Процент (%) смертности	0	0	0	0	0	100	<b>0</b>	100	100	100	100	100	100

**Пример 3 — Этапы 1, 2 и 3б** ( $n_{птиц} = n_{стадия 1} + n_{стадия 2} + n_{стадия 3б} = 4 + 10 + 10$ , число отдельных доз = 19), 2 случая частичной гибели, 3 возврата, испытание завершено.

Число смертей	0	0	0	1	<b>0</b>	0	0	1	1	<b>0</b>	2	1	1	2	<b>0</b>	1	1	1	1
Число испытуемых особей	1	1	1	2	<b>1</b>	2	1	2	1	<b>1</b>	2	1	1	2	<b>1</b>	1	1	1	1
Процент (%) смертности	0	0	0	50*	<b>0</b>	0	0	50*	100	<b>0</b>	100	100	100	100	<b>0</b>	100	100	100	100

**Пример 4 — Этапы 1, 2 и 3б** ( $n_{птиц} = n_{стадия 1} + n_{стадия 2} + n_{стадия 3б} = 4 + 10 + 10$ , число отдельных доз = 19); 1 частичная гибель, 2 возврата. Испытание завершено.

Число смертей	0	0	0	0	0	0	0	1	1	<b>0</b>	2	1	1	2	<b>0</b>	1	1	1	1
Число испытуемых особей	1	1	1	2	<b>1</b>	2	1	2	1	<b>1</b>	2	1	1	2	<b>1</b>	1	1	1	1
Процент (%) смертности	0	0	0	0	0	0	0	50*	100	<b>0</b>	100	100	100	100	<b>0</b>	100	100	100	100

**Пример 5 — Этапы 1, 2 и 3б** ( $n_{птиц} = n_{стадия 1} + n_{стадия 2} + n_{стадия 3б} = 4 + 10 + 10$ , число отдельных доз = 19) 1 частичная гибель, 1 возврат, переходим к этапу 4.

**Приложение С**  
**(рекомендуемое)**

**Расчет рабочих величин LD<sub>50</sub> в случаях, когда смертность наступает в опыте с предельной дозой**

В таблице 1 настоящего стандарта приведены рабочие оценки величины LD<sub>50</sub>, которые можно использовать для расчета доз на этапе 2 последовательного опыта, если проведен эксперимент с предельной дозой и наблюдалась частичная смертность в опытной группе птиц. Однако эта таблица может быть использована только в том случае, если предельная доза составляла 2000 мг/кг массы тела. Если применяли другую предельную дозу, то рабочую оценку LD<sub>50</sub> можно получить по формуле

$$LD_{50} = 10^{\left( \frac{\text{probit}_p}{5} + \log_{10}(\text{пред. доза}) \right)},$$

где  $p$  — наблюдаемая доля погибших особей, а  $\text{probit}_p$  — одна из величин таблицы 3. Для этих расчетов величина наклона принимается равной 5.

Т а б л и ц а 3 — Значения пробит-функции для различного числа (доли) случаев смертности

Смертность (в долях от общего числа наблюдений)	1/10	2/10 или 1/5	3/10	4/10 или 2/5	5/10	6/10 или 3/5	7/10	8/10 или 4/5	9/10
Пробит-функция	3,72	4,16	4,48	4,75	5,00	5,25	5,52	5,84	6,28

## Библиография

- [1] OECD (1996), Report of the SETAC/OECD Workshop on Avian Toxicity Testing, OECD Environmental Health and Safety Publication, Series on Testing and Assessment, No. 5, Monograph OECD/GD (96)166, Paris 1996, available at <http://www.oecd.org/env/testguidelines/>.
- [2] Chapman, P.F., R.Dark, T.A.Springer (2007), Avian Acute Oral Toxicity: A Statistical Evaluation of Sequential Experimental Designs. [In preparation].
- [3] Tucker, R.K. and M.A. Haegele (1971), Comparative acute oral toxicity of pesticides to six species of birds, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 20:57—65.
- [4] Tucker, R.K. and D.G. Crabtree (1970), Handbook of Toxicity of Pesticides to Wildlife, Denver Wildlife Research Center Resource Publication No. 84.
- [5] Smith, Gregory J. (1987), Pesticide Use and Toxicology in Relation to Wildlife: Organophosphorous and Carbamate Compounds, Resource Publication 170, USDI, Washington, DC 171pp.
- [6] Fieller, E.C. (1940), The biological standardization of insulin, *Supplement to the Journal of the Royal Statistical Society*, 7(1): 1—64.
- [7] Crump, K.S. and R. Howe (1985), A review of methods for calculating confidence intervals in low dose extrapolation/ In: D. Krewski, Ed. *Toxicology and Risk Assessment*, CRC Press, Canada.
- [8] Spruill, C. (1983), Kiefer-Wolfowitz Equivalence Theorem. In: Kotz, S. and Johnson, N.L., Eds. *Encyclopedia of Statistical Sciences*, Vol. 4. John Wiley & Sons, Inc, New York.
- [9] Stephan, C. E. (1977), Methods for calculating an  $LC_{50}$ , *Aquatic toxicology and hazard evaluation*, ASTM STP 634, In: F.L. Mayer and J. L. Hamelink, Eds. *American Society for Testing and Materials*, 65—84.
- [10] OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- [11] Richard A. Zann (1996), *The Zebra Finch, a synthesis of field and laboratory studies*, Oxford University Press, 1996, page 52.

Ключевые слова: химическая продукция, окружающая среда, оценка острой пероральной токсичности, птицы

---

Редактор *Е.И. Мосур*  
Технический редактор *И.Е. Черепкова*  
Корректор *Л.С. Лысенко*  
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 02.04.2019. Подписано в печать 22.04.2019. Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Гарнитура Ариал.  
Усл. печ. л. 2,79 Уч.-изд. л. 2,40.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

---

Создано в единичном исполнении ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» для комплектования Федерального информационного фонда стандартов, 117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.  
[www.gostinfo.ru](http://www.gostinfo.ru) [info@gostinfo.ru](mailto:info@gostinfo.ru)