

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/Txxxx—xxxx

化学农药 两栖类动物变态发育 试验准则

Chemical Pesticide—Guideline for the Amphibian Metamorphosis

Assay

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX发布

XXXX-XX-XX实施

中华人民共和国农业农村部发布

前言

本标准按 GB/T1.1-2009 的规则起草。

本标准主要技术内容等效采用了经济合作与发展组织（OECD）化学品测试导则 No.231
《两栖类动物变态发育试验》（英文版 2009），仅做了结构和编辑性修改。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由农业农村部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位：农业农村部农药检定所、浙江省农业科学院农产品质量标准研究所

本标准主要起草人：

化学农药 两栖类动物变态发育试验准则

1 范围

本标准规定了化学农药对两栖类动物变态发育试验的材料、条件、质量控制、试验报告的基本要求。

本标准适用于测试和评价化学农药对两栖类动物变态发育试验,其他类型的农药可参照使用。

本标准不适用于易挥发和难溶解的化学农药。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

吻泄距(The Snout To Vent Length, SVL)

口至肛门的长度。

注:单位为毫米(mm)。

全体长

2.2

最大耐受浓度(The Maximum Tolerated Concentration, MTC)

致死率低于 10%时被试物的最高浓度,一般是已有的急性 LC_{50} 的 1/3。

注:单位为毫克每升(mg/L)。

2.3

被试物 (Test Substance)

试验中需要测试的物质。

2.4

半致死浓度 (Median Lethal Concentration, LC_{50})

指在急性毒性试验中,引起 50%的供试生物死亡时的被试物浓度,用 LC_{50} 表示。

注:单位为毫克有效成分每升(mg a. i. /L)。

3 试验概述

采用流水式或半静态法,将处于 51 期的非洲爪蟾蝌蚪暴露于系列浓度的被试物溶液中 21 d,测定和观察后肢长度(HLL)、吻泄距(SVL)、湿重、日死亡数、发育阶段、甲状腺组织学,评估被试物是否干扰了蝌蚪变态发育进程和甲状腺组织形态。

4 试验方法

4.1 材料和条件

4.1.1 供试生物

4.1.1.1 供试生物

供试生物为非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 蝌蚪。选择受精后 17 天内, 发育至 51 期的健康的、表观正常的蝌蚪。

4.1.1.2 成体爪蟾的繁殖与管理

在实验室条件下, 蝌蚪可自然产卵, 也可通过注射人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 促进产卵以获得试验蝌蚪。选择 3~5 对成体爪蟾注射 hCG (由 0.6%~0.9% 盐溶液溶解) 催产, 雌性注射 800 IU~1000 IU, 雄性注射 600 IU~800 IU。将配对爪蟾置于水缸中, 避免干扰以促其抱对。容器底部应具有不锈钢或塑料材质的网筛假底, 蛙卵应能通过网筛落至缸底。产卵结束并完成受精后, 应立即移走成体爪蟾。

4.1.1.3 蝌蚪幼体选择

收集受精卵并从每窝受精卵中取样评估其质量。选用最佳的 2~3 窝受精卵, 总数量至少 1500 个左右用于培养蝌蚪幼体。将备用的 2~3 窝受精卵分别转移至一个大的平盘或碟中孵化, 并用吸管移除死亡或不正常受精卵。4 天后, 将健康的蝌蚪幼体移至合适数量的饲养容器中 ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), 同一个试验中用到的全部蝌蚪幼体应来自同一批次受精卵。此外, 还需准备额外的蝌蚪以补充首周饲养期间可能死亡的蝌蚪, 保持蝌蚪的饲养密度一致。

4.1.1.4 蝌蚪幼体培养与饲喂

在驯养和 21 d 的试验周期内均用合适的饵料 (如商用饲料、丰年虾及草履虫等) 喂饲蝌蚪。每天应多次少量 (至少两次), 并记录喂饲频率。投饵量在确保使蝌蚪吃饱的同时应尽量减少残饵量, 用虹吸法及时清除残饵和粪便。在移动、清理以及处理蝌蚪的过程中, 尽量降低干扰以减少环境胁迫。饲养期间, 避免噪声、震动饲养容器、环境条件的急剧变化 (如采光、温度、pH、DO、水流速等)。受精卵发育到蝌蚪 51 期应不超过 17 d。发育过程中每日都要进行观察, 以便确定试验暴露开始的时间。培养液每周至少更换两次。

4.1.2 被试物

试验前应收集被试物的基本信息, 例如结构式、水溶解度、稳定性、降解性、挥发性及蒸气压等, 并建立可靠的定量分析方法 (包括添加回收率、仪器检测限等) 和暴露方式。

4.1.3 主要仪器设备

- 玻璃或不锈钢水系统装置;
- 繁殖缸;
- 控温装置 (如加热器或冷冻器, $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$);

- 双目解剖显微镜；
- 数码相机（至少 400 万像素且带有微处理功能）；
- 图像数字化软件；
- 精确至 0.001 g 的分析天平；
- 温度计；
- 溶解氧仪；
- pH 计；
- 照度计；
- 各种实验室常用玻璃器皿及工具；
- 移液器等。

4.1.4 试验用水

试验用水应适合非洲爪蟾蝌蚪正常生长和发育，可采用泉水或活性炭过滤的自来水等当地水源。试验开始前应检测水质。分析水中铜、氯、氯化铵、碘化物、氟化物、高氯酸盐和氯酸盐等的背景值。试验用水的碘（I⁻）浓度在 0.5 µg/L~10 µg/L 时可进行试验。根据试验用水碘离子浓度检测值，加碘至总浓度为 0.5 µg/L~10 µg/L，并记录试验用水中碘或其他盐类的添加情况。

4.1.5 试验容器

试验容器应采用玻璃、不锈钢或其他化学惰性材质。试验容器的容量为 4 L~10 L，水深至少 10 cm~15 cm，流水装置的流速应恒定。

4.1.6 试验条件

使用荧光灯照明，光照度 600 lx~2000 lx，光暗周期为 12 h 光照：12 h 黑暗。水温 22℃±1℃，pH 值 6.5~8.5，溶解氧（DO）>3.5 mg/L（>空气饱和值的 40%）。试验条件具体要求见附录 A。

5 试验步骤

5.1 暴露方法的选择

根据被试农药的特性、稳定性或预备试验结果选择半静态法或流水式方法。采用半静态法时，蝌蚪在试验前及试验过程都应使用同一种水。采用流水式试验时，应定期检查储备液与稀释用水的流量，以确保试验溶液浓度的变化范围在 10% 以内。每 24 h 流量应超过试验容器容积的 5 倍。

溶液制备过程应优先采用简单方法，如搅拌或超声。不推荐使用溶剂或分散剂（助溶剂），如须使用，其用量应小于 0.1 ml/L，且各试验容器中的用量应保持一致。

5.2 试验浓度

从最大溶解度、最大耐受浓度（MTC）和 100 mg/L 三者中选取最低的浓度作为 AMA 试验的最高浓度。按一定比例间距（几何级差应控制在 3~10 倍以内）设置至少 3 个浓度处理及一个空白水对照。若使用溶剂，应同时设置溶剂对照。每个处理组和对照组（包括空白对照和溶剂对照）均应设至少 4 个重复。试验过程中，按完全随机区组设计摆放试验容器。

5.3 试验周期

蝌蚪幼体发育至 51 期开始试验，持续染毒 21 d 结束试验。

5.4 承载量

半静态系统中蝌蚪密度不应超过 4 只/升，流水式系统不应超过 10 只/升。

5.5 染毒

将健康、表观正常的蝌蚪集中至一个容器。进行发育期判定时，将蝌蚪单独转移到盛有培养水的容器中（如培养皿）观察。必要时，可使用 100 mg/L 三卡因间氨基苯酸乙脂甲磺酸（MS-222，使用前用 pH7.0 的碳酸氢钠稀释）进行麻醉后观察判定。可用双目解剖显微镜观察，选择 51 期蝌蚪，其最显著的特征是出现后肢芽（见图 1）。

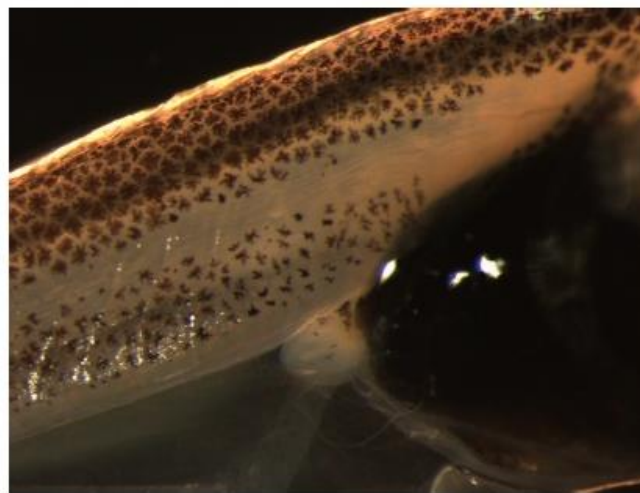


图 1 非洲爪蟾蝌蚪 51 期后肢形态学特征

除 51 期发育特征外，选择试验蝌蚪还应考虑蝌蚪体长因素。在 0 d 染毒前随机测量 20 只 51 期蝌蚪的全体长（全体长测量见图 2-A），选取长度为平均值 ± 3 mm 范围内的蝌蚪（正常发育 51 期的蝌蚪全体长平均值为 24.0 mm ~28.1 mm）。将筛选出的试验蝌蚪放入同一容器。

试验开始时（0 d），将满足上述发育标准的蝌蚪随机分发到每一暴露容器中，每处理至少 4 个重复，每重复 20 只。然后观察是否存在异常（受伤、异常游泳行为等），移除表观异常的蝌蚪并及时补充正常的蝌蚪。

5.6 水质测定

试验期间，至少每周测定一次所有试验容器中的溶解氧、pH 值和温度。同时，对试验

温度进行连续监测（至少监测其中一个试验容器）。

5.7 浓度分析

试验开始前，应建立被试物在试验溶液中的化学分析方法及其定量限（LOQ）、标准曲线和回收率等，并进行方法验证，以确认被试物在试验系统中的稳定性。静态法试验期间，每周至少取样一次（至少 4 个样品）进行化学分析。若采用流水系统，更换时储备液需时进行浓度分析，若处理组全部浓度中均检测不到被试物时，应测定储备液浓度并记录系统流速以便计算理论浓度。若测定浓度超出设定浓度的 80%~120%范围，流水式试验中采用测定浓度的算术平均值表示有效浓度，半静态试验中以测定浓度的几何平均值来表示有效浓度。

5.8 观察与指标测量

5.8.1 第 7 d 测量

于试验第 7 d 从每一重复中随机抽取 5 只蝌蚪，用 150 mg/L~250 mg/L 的 MS-222(以碳酸氢钠缓冲调节 pH 值至 7.0)进行麻醉，并用水漂洗且吸干，测量每只蝌蚪的 HLL 和 SVL，并称重（精确至 mg），宜在双目解剖镜下观察发育阶段。

5.8.2 第 21 d 测量

试验结束时（第 21 d），按上述方法麻醉各重复蝌蚪，用水漂洗且吸干，测量每只蝌蚪的 HLL 和 SVL，并称重（精确至 mg）。将所有蝌蚪的全身或包含下颚的头部组织样本置于 Davidson 's 固定液中固定 48 h 或 72 h，其中每个重复用于组织病理学分析的 5 只蝌蚪单独固定。应先调查空白对照组，统计空白对照组发育期的中位数，并据此从每重复中选择 5 只蝌蚪，其发育期与空白对照组发育期中位数一致。若一个重复中合适发育期的蝌蚪大于 5 只，则从中随机选择。若一个重复中合适发育期的蝌蚪小于 5 只：1）暴露组延缓了发育程度，则从发育期略低中位数的蝌蚪中选择补充；2）暴露组加速了发育程度，则从发育期略高于中位数的蝌蚪中选择补充。

若处理组蝌蚪的所有发育期与对照组的中位数没有交集，只有在这种情况下，可以选择与空白对照中位数发育期不同，但符合本重复发育期的蝌蚪样品，用于甲状腺组织病理学分析。此外，若发育阶段不明确（如各部位发育不同步），则从每个重复随机选择 5 只蝌蚪用于组织病理学分析。应在报告中说明不依据对照中位数发育期进行蝌蚪取样的根据。

5.8.3 生物端点的确定

在 21 天暴露期，主要端点值在 7 d 和 21 d 测量，同时也需每天观察死亡率。表 1 列出测量调查端点和观察时间点。其中，发育阶段、HLL、SVL 和湿重是蝌蚪变态发育试验(AMA)的顶端端点值。

表 1 AMA 试验主要端点观察时间

基本终点	每天	7d	21d
死亡率	√		
发育阶段		√	√
HLL		√	√
SVL		√	√
湿重		√	√
甲状腺组织			√

蝌蚪发育阶段：采用 Nieuwkoop 和 Faber 的分期标准（见表 2）确定蝌蚪的发育期。根据发育期数据可确定蝌蚪发育加快、不同步、延迟或无影响。比较处理组与对照组蝌蚪的中位数发育期，判断发育过程的加快或延迟。在组织检验没有畸形或异常，而发育不同步的状况应写入报告，但是不需记录个别蝌蚪的形态形成时间差异或组织发育干扰。

表 2 基于 Nieuwkoop 和 Faber 分类方法的显著性形态学特征

显著形态学特征	发育阶段															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
后肢	X	X	X	X	X	X	X									
前肢						X	X	X	X	X						
颅面结构										X	X	X	X			
嗅觉神经形态学											X	X	X			
尾长													X	X	X	X

体长与湿重：应在试验的第 7 d、第 21 d 分别测量 SVL 与湿重。SVL 测量方法见图 2-A 所示。

后肢长度：应在试验的第 7 d、第 21 d 分别测量左后肢的长度，如图 2-B 所示，第 7 d 可直接测量 HLL。第 21 d 时应将后肢贴于身体并沿其中线测量。

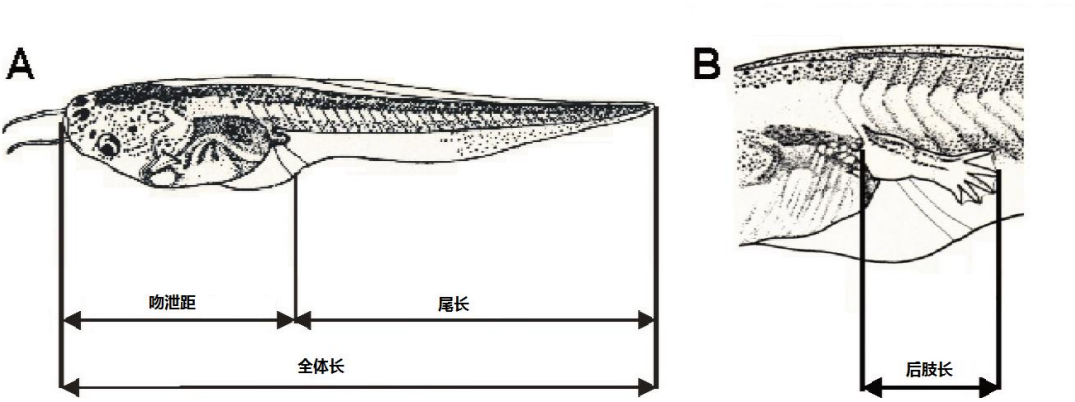


图 2 A.体长测量的类型 B.后肢长度的测量

甲状腺组织学：诊断的标准包括甲状腺肿大/萎缩、滤泡细胞肥大或增生，以及其他定性标准：滤泡内腔面积、胶体性质及滤泡细胞高度/形状，还需记录严重性分级（4级）。若发育加速或不同步的端点出现明显而重大的变化时，则不必分析甲状腺作组织病理学。若缺少明显的形态学变化或发育延缓的证据时需进行病理学分析。

死亡率：每天应观察容器中蝌蚪死亡情况的并及时记录，包括死亡的数量、日期、浓度及容器编号。死亡的蝌蚪应及时清除。

其他指标：应记录异常行为与可见的畸形或损伤，包括这些症状的日期、浓度、容器编号。水中蝌蚪的正常行为特征，悬浮在水体中时尾部高于头部、尾鳍有节奏的拍打、周期性的浮出水面、鳃盖正常活动、应激性等。异常行为可能包括浮在水面、躺在容器底部、反向或不规则游动、缺少浮出水面的行为、无激物反应等。处理组间食物消耗总量差异也应记录。畸形与损伤应包括形态学异常（如肢体变形）、出血损伤、细菌或真菌感染及其他症状。这些判断都是定性的，并与对照组作比较。若处理组比对照组产生症状的几率大，则应视为被试物有明显的毒性作用。

5.9 统计分析

根据方差齐性检验结果，选用合适的统计方法对处理组与对照组之间的差异进行比较。所有符合单调剂量-效应关系的连续性数量型端点数据（HLL、SVL、湿重），用Jonckheere-Terpstra 检验处理间的差异显著性。

对于非单调剂量-效应关系的连续性数量型端点数据，应检验其正态分布性（推荐用Shapiro-Wilk或Anderson-Darlin检验）和方差齐性（推荐用Levene方法检验）。以上检验方法均以方差分析（ANOVA）的残差为基础进行。也可用专家判断代替以上正态分布和方差齐性检验，但只作为备选方案。如发现非正态分布或参数异质时，应尝试进行正态分布和参数转化。如果数量为正态分布和方差齐性（包括转化后的数据），采用Dunnett's检验分析处理效应的差异显著性。如果数据为正态分布（包括转化后的数据）但方差不齐性，采用Tamhane-Dunnett 检验或、T3检验 或Mann-Whitney-Wilcoxon U 检验分析确定处理的差异显著性。没有合适的方法进行正态转换时，用Mann-Whitney-Wilcoxon U 检验分析处理效应的显著性，并通过Bonferroni-Holm校正p值。Dunnett检验可独立用于所有方差分析F检验，Mann-Whitney检验可独立用于任何整体H检验（Kruskal-Wallis）。

不希望试验出现显著的蝌蚪死亡，但当死亡率呈现单调剂量-效应关系时，需采用Cochran-Armitage（CAT）趋势检验分析差异显著性，否则采用Bonferroni-Holm校正的Fisher检验方法。

对发育阶段的显著性差异统计，可对各重复的中位数进行Jonckheere-Terpstra 检验。或者对第20百分位至第80百分位数据进行多重Jonckheere 检验，因该法考虑到了数据的分布特性，应优先使用。

应以重复的数据为单位进行分析，在 Jonckheere-Terpstra 或 Mann-Whitney 进行 U 检验时，会使用重复的中位数，采用 Dunnett 检验时，会使用重复的平均值，重复和处理组的平均值或中位数可以明显体现剂量-效应关系的单调性。对照组或处理组少于 5 个重复的情况下，可采用确切排列版本的 Jonckheere-Terpstra 检验和 Mann-Whitney 检验。上述所有检验方法所选用的统计学显著性水平均为 0.05。

对连续数据进行统计检验的流程参见附录 B。

5.10 质量控制

质量控制应满足以下条件：

——21d 试验过程中，维持受测定试验浓度的变异系数 $\leq 20\%$ ；

——无明显毒性的试验浓度 ≥ 2 个；

——对照组发育阶段分布的第 10 百分位与第 90 百分位的差异不得超过 4 期，且发育阶段中位数 ≥ 57 期；

——半静态法时，试验液更新间隔不得超过 72 h；

——甲状腺效应为阴性的有效试验，任一处理（包括对照）死亡率 $\leq 10\%$ ，每个重复死亡蝌蚪不得超过 3 只，否则作为缺陷重复；至少两组处理的所有 4 个重复不存在缺陷重复，都可用于分析；至少具有两组处理没有明显毒性，都可用于分析。

6 试验报告

试验报告应至少包括以下内容：

a) 被试物

——被试物特性：物理化学性质、稳定性和生物降解性的相关信息；

——溶剂（其他溶剂而不是水）：选择溶剂的合理性、溶剂的特性（性质与使用的浓度）。

b) 供试蝌蚪

——名称、品系、大小、来源，受精卵的收集及其后续处理方法。

c) 试验条件

——试验程序，如半静态法或流水式法，承载量等；

——光照周期；

——试验设计（例如处理组的数量，每个处理组的重复数，每个重复中的数量，试验容器的材质和尺寸、每个容器中水的体积等）；

——贮备液制备方法，试验液更新频率（如使用了助溶剂，还须给出其名称及浓度）；

——被试物暴露装置（如泵、循环计数、压力）；

——分析方法：定量限、检出限、添加回收样品的标称浓度及其回收率、实测浓度平均值及其标准差等；

——试验浓度、平均实测值及其标准偏差；

——试验用水特性：pH 值、温度、溶解氧浓度、总碘以及其他测量指标；

——试验期间水质情况：pH、硬度、温度和溶解氧浓度等；

——饲喂信息（饲料种类、来源、饲喂量和饲喂频率）。

d) 结果

——生物学观察结果与数据：包括每日死亡数、食物消耗量、异常游动行为、嗜睡、平衡力差、畸形、损伤等，定期观察症状并记录，包括发育阶段、HLL、SVL、湿重，原始记录表格参见附录 C；

——统计分析方法及方法的合理性；统计分析结果（推荐以表格形式呈现）。

——组织学数据：包括叙述性的描述、严重度分级以及特定观察现象发生的几率；

——附加的观察：包括上面观察范围之外的叙述性的描述；

——试验偏离；

——结果讨论，开发了实施 AMA 试验的决策逻辑用于辅助试验的开展和结果解释，参见附录 D。

附录 A
(规范性附录)

AMA 21 天试验条件

关于试验条件具体要求见表 A.1。

表 A.1 AMA 21 天试验条件

实验动物	非洲爪蟾幼体	
初始幼体发育阶段	NF 51	
暴露周期	21d	
幼体选择标准	发育阶段与全体长（可选）	
试验浓度	一个数量级至少 3 个浓度梯度	
暴露条件	流水式（建议用）或静水更新系统	
试验系统流速	25mL/min（大概 2.7h 可完全更新原水）	
主要终点	死亡率	每天
	发育阶段	7d、21d
	HLL	7d、21d
	SVL	7d、21d
	湿重	7d、21d
	甲状腺组织学	21d
稀释水/实验室控制	脱氯自来水（活性炭过滤）的或实验室的同等资源	
幼体密度	20 只/容器（5L）	
试验溶液/试验容器	4L~10L（水深至少 10cm~15cm）/玻璃或不锈钢容器	
重复设置	4 重复容器/浓度与对照	
对照组可接受的死亡率	每容器≤10%	
甲状腺固定	固定数目	全部蝌蚪（初始评价 5 只/重复）
	部位	头部或整个身体
	固定液	Davidson's 固定液
喂饲	食物	商用饲料、丰年虾、草履虫等
	数量/频率	至少一天两次
光照	光周期	12h 光/12h 暗
	光照	600 lx ~2000lx（在水表面测量）
水温	22℃±1℃	
pH	6.5~8.5	
DO	>3.5mg/L（>40%空气饱和值）	
样品化学分析频率	每周一次（4 样品/试验）	

附录 B
(资料性附录)
连续性效应数据统计检验流程图

B.1 连续数据统计检验流程参见图 B.1。

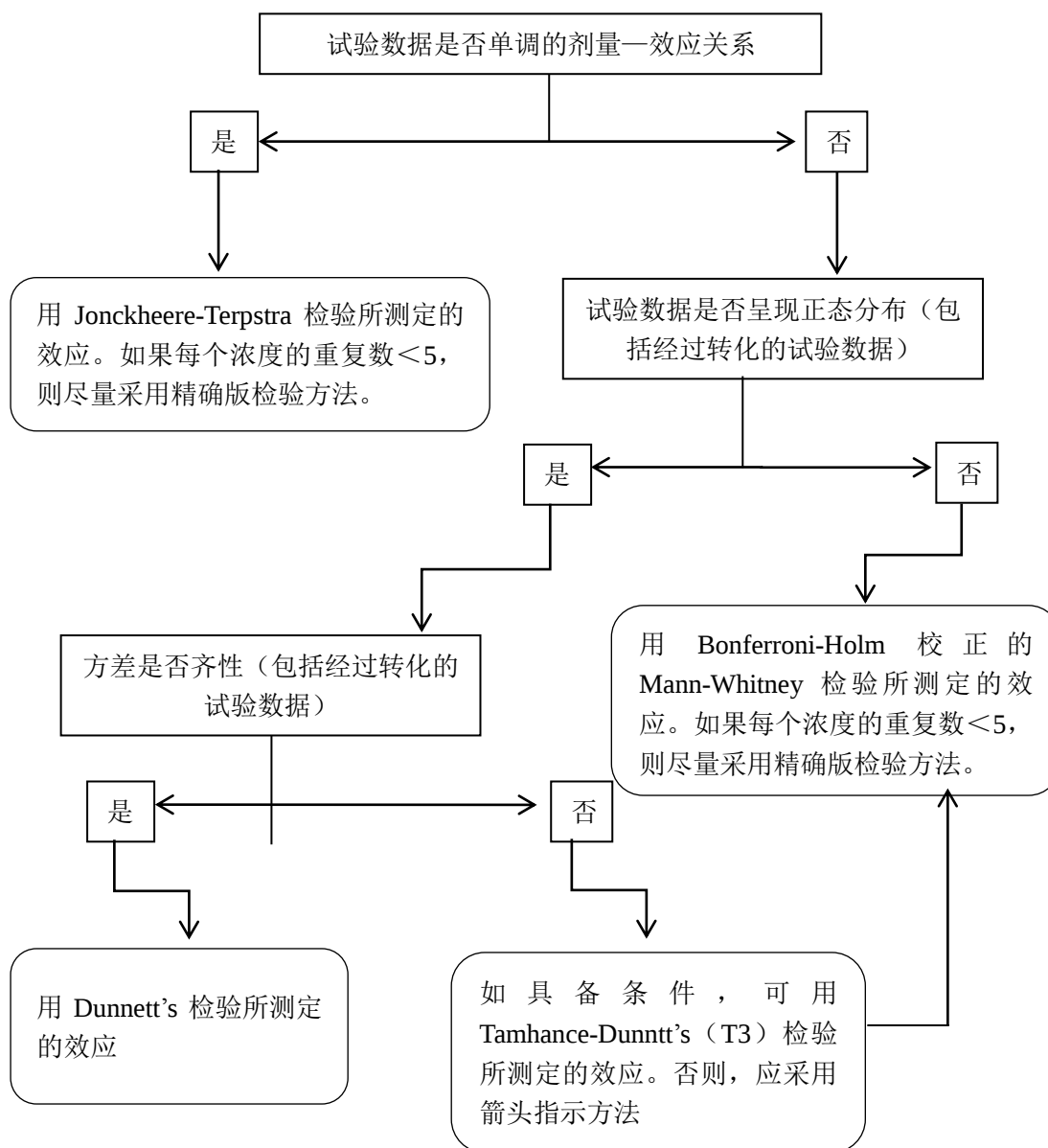


图 B.1 连续数据统计检验流程

B.2 特殊数据的分析

B.2.1 缺陷处理的使用

当某一重复或整个处理组表现明显毒性时,在统计分析时是否被剔除时应考虑多种因素。明显毒性是指任何重复中蝌蚪死亡数大于 2 只,该死亡是由于被试物毒性引起的而非技术失误造成。其他明显毒性的标志还包括出血、异常行为、异常游动姿势、厌食以及其他疾病的临床症状。对于亚致死的毒性标志,需与净水对照比较作量化评价。

B.2.2 溶剂对照

试验结束时,通过溶剂对照与净水对照的统计学比较(如发育阶段、SVL、湿重)评价溶剂的潜在效应。若净水对照与溶剂对照出现了明显的差异,则在判断毒性效应试验终点时要应用净水对照。若无明显差异,判断毒性效应试验终点时应合并使用空白对照和溶剂对照。

B.2.3 处理组发育至 60 期或更高

蝌蚪 60 期后,蝌蚪组织开始吸收,引起形体大小与体重下降。因此,蝌蚪的湿重与 SVL 数据不能用于生长速率差异的统计分析。因此,在计算重复平均值和中位数时,剔除大于 60 期蝌蚪的湿重和体长数据。使用以下两种方法分析这类生长相关的参数。

一种方法是在统计分析湿重或 SVL 数据时,只考虑发育期小于和等于 60 期蝌蚪的数据。

反之,在评价被试物对生长的影响时就要应用双因素嵌套方差分析,同时考虑超期发育对生长的影响。由于只有少部分试验生物($\leq 20\%$)的数据被剔除,该方法被认为能够为生物影响的严重度提供足够的信息。如果一个或更多的设计浓度存在较多数量蝌蚪发育超过 60 期($\geq 20\%$),则应采用双因素嵌套方差分析评估蝌蚪的生长影响,同时考虑所有试验处理组与发育至后期蝌蚪的影响。

双因素嵌套方差分析:将每只发育期大于等于 61 期的蝌蚪定义 LateStage= 'Yes',反之为 'No'。建立双因素方法分析,一个因子为浓度对应 LateStage 为效应,另一随机因子为处理组的重复对应的随机效应为重复的蝌蚪。若数据分布违背了方差分析对于正态性或方差齐性的要求,则需要将数据转化成正态分布。

除了对试验浓度、LateStage 及其关联进行标准的 ANOVA F 检验,这种关联 F 检验还可分成两个 ANOVA F 检验,一个关于平均效应对浓度的 LateStage= 'No' 结果,另一个是关于平均效应对浓度的 LateStage= 'Yes' 结果。可进一步比较处理与对照组的 LateStage 的每一水平。还能对 LateStage 每一重复的处理组平均值与对照组的进行比较。仅在相应的 F 检验不显著时采用 Bonferroni-Holm 校正 P 值。

附录 C
(资料性附录)
原始数据与概要数据统计表

C.1 一般测试化学信息参见表 C.1。

表 C.1 一般测试化学信息

化学信息	
被试物，浓度单位以及处理组	
被试物：	
浓度单位	
处理组 1：	
处理组 2：	
处理组 3：	
处理组 4：	
日期（第 0 天）	00/00/00
日期（第 7 天）	00/00/00
日期（第 21 天）	00/00/00

C.2 第 7 天与第 21 天原始数据表格参见表 C.2。

表 C.2 第 7 天与第 21 天原始数据表格

第 天 日期:

行	浓度	处理组编号	重复	个体数	个体编号	发育阶段	吻泄距 (mm)	后肢长度 (mm)	湿重 (mg)
ROW	TRT	TRT#	REP	IND	D#	STAGE	SVL	HLL	WEIGHT
1	0.00	1							
2	0.00	1							
3	0.00	1							
4	0.00	1							
5	0.00	1							
6	0.00	1							
7	0.00	1							
8	0.00	1							
9	0.00	1							
10	0.00	1							
11	0.00	1							
12	0.00	1							
13	0.00	1							
14	0.00	1							
15	0.00	1							
16	0.00	1							
17	0.00	1							
18	0.00	1							
19	0.00	1							
20	0.00	1							
21	0.00	2							
22	0.00	2							
23	0.00	2							
24	0.00	2							
25	0.00	2							
26	0.00	2							
27	0.00	2							
28	0.00	2							
29	0.00	2							
30	0.00	2							
31	0.00	2							
32	0.00	2							
33	0.00	2							
34	0.00	2							
35	0.00	2							
36	0.00	2							
37	0.00	2							
38	0.00	2							
39	0.00	2							
40	0.00	2							
41	0.00	3							
42	0.00	3							
43	0.00	3							
44	0.00	3							
45	0.00	3							
46	0.00	3							
47	0.00	3							
48	0.00	3							
49	0.00	3							
50	0.00	3							
51	0.00	3							
52	0.00	3							
53	0.00	3							
54	0.00	3							
55	0.00	3							
56	0.00	3							
57	0.00	3							
58	0.00	3							
59	0.00	3							
60	0.00	3							
61	0.00	4							
62	0.00	4							
63	0.00	4							
64	0.00	4							
65	0.00	4							
66	0.00	4							
67	0.00	4							
68	0.00	4							
69	0.00	4							
70	0.00	4							
71	0.00	4							
72	0.00	4							
73	0.00	4							
74	0.00	4							
75	0.00	4							
76	0.00	4							
77	0.00	4							
78	0.00	4							
79	0.00	4							
80	0.00	4							

C.3 第 7 天与第 21 天试验数据计算概要表格参见表 C.3。

表 C.3 第 7 天和 21 天试验数据计算概要

浓 度	重 复	发育阶段			SVL (mm)		HLL (mm)		重量 (mg)	
		最小 值	中值	最大 值	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差	平均 值	标准 偏差
1	1									
1	2									
1	3									
1	4									
2	1									
2	2									
2	3									
2	4									
3	1									
3	2									
3	3									
3	4									
4	1									
4	2									
4	3									
4	4									

注：单元格内计算取决于表 C.2 中输入的数据。

C.4 每日死亡情况表格参见表 C.4

表 C. 4 每日死亡情况

第天	日期	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0																	
1																	
2																	
3																	
4																	
5																	
6																	
7																	
8																	
9																	
10																	
11																	
12																	
13																	
14																	
15																	
16																	
17																	
18																	
19																	
20																	
21																	
重复数		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
处理数		0				0				0				0			

C.5 水质标准表格参见表 C.5。

表 C. 5 水质标准

暴露系统（流水式系统/半静态系统）:
湿度:
光照强度:
光照周期:
喂食:
饲喂量:
水质 pH:
试验用水碘浓度:

C.6 化学分析数据汇总表格参见表 C.6。

表 C. 6 化学分析数据汇总

化学名称:																	
CAS:																	
第天	日期	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0																	
1																	
2																	
3																	
4																	
5																	
6																	
7																	
8																	
9																	
10																	
11																	
12																	
13																	
14																	
15																	
16																	
17																	
18																	
19																	
20																	
21																	
重复数		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
处理数		0				0				0				0			

C.7 重要指标的组织病理学报告表格参见表 C.7。

附表 C.7 重要指标的组织病理学报告

日期： 被试物： 病理学家：

		甲状腺 肥大	甲状腺 萎缩	滤泡细胞 增生	滤泡细 胞肥大
对照组	蝌蚪个体				
	-				
	重复 1				
对照组	蝌蚪个体				
	-				
	重复 2				
总计					

		甲状腺 肥大	甲状腺 萎缩	滤泡细胞 增生	滤泡细 胞肥大
剂量	蝌蚪				
	-				
	重复 1				
剂量	蝌蚪				
	-				
	重复 2				
总计					

		甲状腺 肥大	甲状腺 萎缩	滤泡细胞 增生	滤泡细 胞肥大
剂量	蝌蚪				
	-				
	重复 1				
剂量	蝌蚪-				
	重复 2				
总计					

		甲状腺 肥大	甲状腺 萎缩	滤泡细胞 增生	滤泡细 胞肥大
剂量	蝌蚪				
	-				
	重复 1				
剂量	蝌蚪				
	-				
	重复 2				
总计					

C.8 其他组织病理学指标表格参见表 C.8。

表 C.8 其他组织病理学指标

日期： 被试物： 病理学家：

		滤泡细胞内腔增大	滤泡细胞内腔变小
对照组 蝌蚪个体 - 重复 1			
对照组 蝌蚪个体 - 重复 2			
总计			
		滤泡细胞内腔增大	滤泡细胞内腔变小
剂量 蝌蚪- 重复 1			
剂量 蝌蚪 - 重复 2			
总计			

		滤泡细胞内腔增大	滤泡细胞内腔变小
剂量 蝌蚪 - 重复 1			
剂量 蝌蚪 - 重复 2			
总计			
		滤泡细胞内腔增大	滤泡细胞内腔变小
剂量 蝌蚪 - 重复 1			
剂量 蝌蚪 - 重复 2			
总计			

C.9 组织病理学发现概述表格参见表 C.9。

表 C.9 组织病理学发现概述

日期:

被试物:

病理学家:

对照组 蝌蚪个体 - 重复 1		
对照组 蝌蚪个体 - 重复 2		

剂量 蝌蚪 - 重复 1		
剂量 蝌蚪 - 重复 2		

剂量 蝌蚪 - 重复 1		
剂量动物 - 重复 2		

剂量动物 - 重复 1		
剂量 蝌蚪 - 重复 2		

C.10 AMA 试验汇总表模板表格参见表 C.10。

表 C.10 AMA 试验第（7 或 21）天汇总表模板

试验 终点	重复	对照组				剂量 1					剂量 2					剂量 3				
		平均值	标准偏差	变异系数	样本量	平均值	标准 偏差	变异 系数	样本量	P 值	平均值	标准 偏差	变异 系数	样本量	P 值	平均值	标准 偏差	变异 系数	样本量	P 值
HLL (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	平均值																			
SVL (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	平均值																			
湿重 (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	平均值																			

C.11 AMA 试验发育阶段汇总表模板表格参见表 C.11。

表 C.11 AMA 试验第（7 或 21 ）天发育阶段汇总表模板

	重复	对照组				剂量 1					剂量 2					剂量 3				
		中值	最小值	最大值	样本量	中 值	最小值	最大值	样本量	P 值	中值	最小值	最大值	样本量	P 值	中值	最小值	最大值	样本量	P 值
发育 阶段	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	平均值																			

附录 D
(资料性附录)

开展 AMA 试验的判定逻辑

D.1 AMA 试验的判定逻辑为试验操作与结果分析提供帮助，参见图 D.1。判定本质上加强了加速发育、“不同步发育”、甲状腺组织病理学等终点的重要性，而相对地弱化了发育延缓、SVL 及湿重等受一般毒性影响的试验结果的重要性。

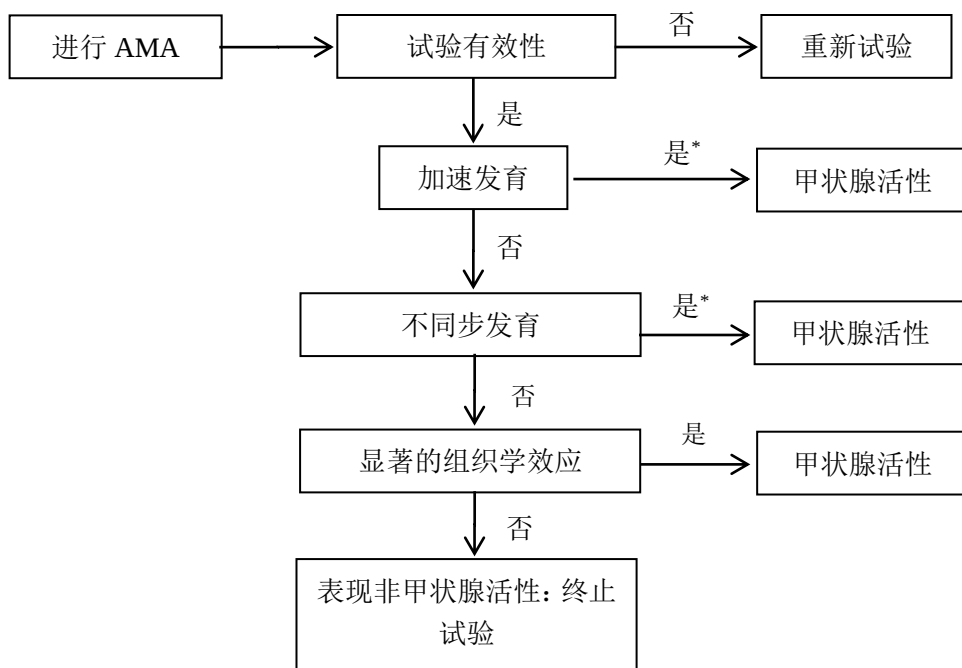


图 D.1 AMA 的判定逻辑流程图

*尽管加速发育与“不同步发育”发生了显著的变化，但是某些权威机构还要求进行组织学分析。试验人员应咨询相应的管理部门以确定哪些试验终点是必需的。

D.2 加速发育

以下 4 个终点的统计学分析结果可用于评价受试蝌蚪相对于对照蝌蚪发育速度是否有所加快。

- a) 7 天 HLL（以 SVL 值标准化）。
- b) 21 天 HLL（以 SVL 值标准化）。
- c) 7 天发育程度。
- d) 21 天发育程度。

HLL 的统计分析以左后肢长度为准，并以 HLL 与 SVL 之比对其进行标化。比较每一处理浓度的标化平均值。如果暴露组 7 天或 21 天标化的后肢长平均值显著大于对照组，则说明被试物加速了蝌蚪的发育。

发育阶段依据 Nieuwkoop 和 Faber 形态学特征标准判定。如果暴露组 7 天或 21 天发育阶段与对照组有显著增加，则表明被试物加速了蝌蚪的发育。

AMA 试验方法中，以上 4 个终点中任何一个有显著效应都可认为加快了发育速度。

D.3 不同步发育（由发育阶段标准判定）

“不同步发育”，是指特定组织在发育过程中与其他组织发育出现了偏差的现象。典型的表型包括前腿缺失或出现延缓而后腿与尾部正常或加速发育，或者鳃部吸收早于后腿出现与尾部吸收。不同步发育的特征为同一蝌蚪内不同组织的形态发生与发育时间节点不一致，无法利用一系列典型的形态学观察终点来清晰地描述其发育阶段。

判断受试动物相比于对照组是否出现“不同步发育”现象需要基于第 7 天和第 21 天形态学特征变化的总体评价。评价器官变态的主要形态学特征包括后肢发生、前肢发生、前肢变形、尾部吸收（特别是尾鳍吸收）、头部变形（鳃的大小与鳃吸收的程度、下颚变形、Meckel's 软骨突出）。

因而，判断异常的形态生长即为“不同步发育”的中心标准是：组织改变与组织形态产生的相应同步性被扰乱而受影响的组织的形态学特征并没有发生明显的变化。例如“形态发生异常现象这一描述，与其他组织的发育相比后肢的出现是延缓的”，这一现象属于“不同步发育”，而缺少后肢、异常脚趾现象（缺趾、多趾）或其他明显的畸形肢都不应看做是“不同步发育”。

不同的化学作用会产生不同的形态变化。典型的表型包括后肢与尾部正常或前趋发育而前肢的出现会延缓或缺失；相比于后肢与尾部变形，鳃部吸收过早。

D.4 组织病理学

若化学物质没有明显的毒性效应且没有加速发育或引起不同步发育，则需要进行甲状腺的病理学分析。判断一种效应是否与被试物的暴露有关需要向专业的病理学者咨询。

D.5 延迟发育（根据发育阶段、HLL、湿重和 SVL 判定）

延迟发育可在抗甲状腺机制和间接毒性作用下发生。轻度的发育延迟伴随明显毒性症状很有可能表明产生非特异性毒性效应。非甲状腺毒性评价是试验的必要部分。过多的死亡数表明存在着其他毒性作用机制。同样，生长轻度不良（由湿重或 SVL 判断）也是非甲状腺毒性效应。通过对正常发育产生负效应（刺激效应）的被试物处理后，通常会观察到生长显著增加。因此，体重较大蝌蚪的出现并不能说明就是非甲状腺毒性作用。然而，生长情况不能单独地用于判断甲状腺毒性效应，而需要将生长、发育、甲状腺病理学联系起来。其他观察终点也需要考虑进来，包括水肿、出血损伤、嗜睡、食物消耗量降低、无规律的/变化的游动行为等。如果所有试验浓度都具有明显的毒性作用，应设计较低浓度以重新评价被试物是否具有影响甲状腺活动的能力。

统计结果显示明显的发育延迟，且无其他明显毒性效应的症状，则表明被试物具有影响甲状腺活动的能力（拮抗体）。若差异无统计学意义，可在甲状腺病理学分析中进一步验证这一结论的正确性。

参 考 文 献

- [1]OECD (2009). Guideline 231: Amphibian Metamorphosis Assay. OECD Guidelines for testing of chemicals.
- [2] US EPA(2009). Amphibian Metamorphosis (Frog)(OPPTS 890.1100). Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines.
- [3]OECD (2004). NO. 46: Detailed review paper on amphibian metamorphosis assay for the detection of thyroid active substances. ENV/JM/MONO(2004)17.
- [4]ASTM(2014).Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials,,ASTMInternational E729-96(2014), West Conshohocken, PA.
- [5]GB/T31270.18-2014 化学农药环境安全评价试验准则第18部分天敌两栖类急性毒性试验.